

修士学位論文

題 名

イネの根特異的ストレス応答遺伝子 *RSOsPR10* の発現制御機構の解明

指導教授

小柴 共一

教授

平成 27年 1月 9日 提出

首都大学東京大学院

理工学研究科

生命科学

専攻

学修番号

13881341

氏 名

山本 昂宏

目次

目次.....	1
略語.....	3
要旨.....	4
序論.....	10
材料と方法.....	15
植物材料.....	15
イネの生育方法.....	15
遺伝子型の確認.....	15
植物ホルモンによる <i>RSOsPR10</i> の発現誘導処理.....	16
qRT-PCR.....	16
一過的発現系の解析.....	18
particle bombardment 法による遺伝子導入.....	19
LUC 活性測定.....	21
エフェクターコンストラクトの作製(35S::ERF1, ERF83, ERF88).....	21
エフェクターコンストラクトの作製(35S::ERF87).....	23
ゲルシフトアッセイ.....	25
結果.....	27
イネ根への particle bombardment 法による遺伝子導入実験系の確立.....	27
一過的発現系による発現制御領域の検討.....	27
<i>RSOsPR10</i> プロモーター領域におけるシス配列の探索.....	28
<i>RSOsPR10</i> の JA/ET による発現誘導に関わるシス配列の検討.....	28
<i>RSOsPR10</i> の JA/ET による発現誘導における OsERF1 の関与.....	29
<i>RSOsPR10</i> の発現制御に関わる新規誘導因子の同定.....	29
<i>RSOsPR10</i> の SA による発現誘導抑制に関わる転写因子の検討.....	30
<i>RSOsPR10</i> の SA による発現誘導抑制に関わるシス配列の検討.....	30
OsWRKY76 の W-box 配列への結合解析.....	30
考察.....	32
イネ根における particle bombardment 法による一過的発現実験系の確立.....	32
<i>RSOsPR10</i> 遺伝子の発現誘導制御機構.....	33
<i>RSOsPR10</i> 遺伝子の誘導抑制機構.....	34
<i>RSOsPR10</i> 発現制御機構のモデル.....	36
イネにおける JA/ET による誘導と SA による抑制にの生物学的な意味.....	37
引用文献.....	38

研究倫理.....47

謝辭.....48

圖.....49

略語

ABA: abscisic acid

ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid

BTH: benzothiadiazole

ET : Ethylene

FLUC: Firefly Luciferase

ERF: Ethylene Responsive Factor

GUS, β -glucuronidase

JA : Jasmonic Acid

KD: Knock Down

KO: Knock Out

LUC : Luciferase

MBP: maltose-binding protein

OsERF1 : *Oryza sativa* ethylene responsive factor 1

OX: Over expression

PBZ : Probenazole

PR : Pathogenesis-Related

qRT-PCR : quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

RLUC: Renilla Luciferase

RSOsPR10 : Root Specific *Oryza sativa* Pathogenesis-Related 10

SA : Salicylic Acid

イネの根特異的ストレス応答遺伝子 *RSOsPR10* の発現制御機構の解明

山本 昂宏 (植物ホルモン機構研究室)

要旨

植物は常に様々な生物学的あるいは非生物学的ストレスにさらされている。植物の根は水分や栄養の吸収だけでなく、病傷害、乾燥、塩ストレスなど環境ストレスに対する応答においても重要な役割を担っている。植物体内におけるこうしたストレス応答において大きな役割を担っているのが、サリチル酸 (SA)、ジャスモン酸 (JA)、エチレン (ET)、アブシシン酸 (ABA) などの植物ホルモンである。病傷害関連の応答には、主に SA, JA, ET の関与が知られており、各種のストレスに対応した経路が働き応答タンパク質等が誘導され抵抗性を獲得する。中でも一群の感染応答タンパク質 (PR protein: Pathogenesis-Related protein) ファミリーが耐性獲得に大きく関与することが知られている。

RSOsPR10 (Root Specific *Oryza sativa* PR 10) は、当研究室でのイネの根におけるプロテオーム解析において、塩や乾燥処理により発現が根特異的に誘導されるタンパク質として単離された PR タンパク質である。これまでに、*RSOsPR10* の根特異的な発現は、塩、乾燥、傷害などのストレス刺激受容後、JA や ET を介して誘導され、その誘導が SA によってほぼ完全に抑制されることが転写レベルおよび翻訳レベルで明らかにされている。この発現誘導には、ET および JA 応答性の転写因子である OsERF1 の関与が推定されている。一方、SA による発現誘導抑制については、最近の結果から病害応答関連の転写抑制因子である OsWRKY76 の関与が示唆されている。また、*RSOsPR10* 遺伝子上流 0.6 kb および 1.9 kb を GFP レポーターに繋いだコンストラクトを導入した形質転換イネでは地上部および地下部での GFP シグナルの強度に変化はなく、根特異的発現、ストレス応答といった *RSOsPR10* の発現制御に関わる領域は 2 kb よりも上流にあると考えられている。さらにプロモーター上流の発現制御領域を検討するため、遺伝子上流 1.9 kb, 2.9 kb, 4 kb を GUS レポーターに繋いだコンストラクトを導入した形質転換イネを用いて解析したところ、JA や ACC により *1.9K* では根特異的な応答性がほとんどみられないのに対し、*2.9K* および *4K* では根特異的な応答性がみられたことから *RSOsPR10* の発現を制御する主要なプロモーター領域が 1.9~2.9 kb の間に存在することが示唆されている。しかしながら、その詳細な機構は明らかとなっていない。そこで本研究では、*RSOsPR10* の発現制御に関わるプロモーター領域のシス配列とトランス因子を明らかにするために、firefly luciferase (FLUC) / renilla luciferase (RLUC) レポーターを用いたデュアル LUC アッセイによる解析を進めた。

まず、イネの根において particle bombardment 法による遺伝子導入が有用であるか検討するため、先行研究で根特異的な JA 応答性および SA 抑制が確認されている *RSOsPR10* の 4 kbp プロモーター領域を LUC レポーターに繋いだコンストラクトを導入した。その結果、JA による誘導と SA による誘導抑制が確認出来たため、以下の実験に取り組んだ。

(1) *RSOsPR10* の 1.9, 2.7, 2.9, 3.3 および 4 kbp プロモーター領域を LUC レポーターに繋

いだコンストラクト(1.9K, 2.7K, 2.9K, 3.3K, 4K) を作製し、イネの根に導入した。その結果、2.9Kでは顕著な JA 応答性が見られたが 2.7Kでは僅かな誘導しか見られなかった。一方で、1.9Kでは JA 応答性が見られず、3.3Kおよび 4K は 2.9Kと同程度の JA 応答性が見られた。このことから、2.7~2.9 kbp の 223 bp の領域に JA 誘導に関わるシス配列の存在が考えられた。この領域には ERF 結合配列 GCC-box が 4 つ密集して存在している。そこで、GCC-box 4 つのうち一つに変異を入れた 2.9Kコンストラクトでは JA 誘導に変化が見られなかったが、4 つに変異を入れると、JA による誘導レベルは 2.7Kと同程度にまで減少した。

(2) JA/ET の下流で GCC-box に結合する転写因子 OsERF1 が *RSOsPR10* の発現誘導に関与するか検討するため、*OsERF1* 遺伝子上流に T-DNA が挿入された変異体 (*ERF1* KD) イネを入手し qRT-PCR による発現解析を行った。WT と比較し、*ERF1* KD では *ERF1* の発現量が低下していることが確認された。その上で *RSOsPR10* の転写レベルでの発現量を調べた結果、WT と比較して有意に誘導が減少していた。しかし、*35S::ERF1* を 2.9Kと共導入してレポーターアッセイを行ったが、プロモーター活性に影響は与えなかった。

(3) OsERF1 以外の JA/ET 誘導因子候補探索のため、シロイヌナズナで JA/ET 誘導因子として報告のある *ORA59* に配列が類似するイネ ERF ファミリーの中から OsERF83、OsERF87 および OsERF88 をクローニングし、2.9Kと共導入した。すると、OsERF87 に高い誘導活性のあることが見出された。OsERF87 の機能に関してはこれまでに全く報告がなく、イネの JA/ET 経路における新規の転写因子として同定した。

(4) SA による誘導抑制について、SA の下流で働く OsWRKY76 の関与を検討した。OsWRKY76 過剰発現イネの根に 2.9Kを導入したところ、WT と比較して有意に JA による誘導が抑制された。また、WT イネに 2.9Kと *35S::WRKY76* を共導入したレポーターアッセイにおいても強い抑制が確認された。上述のように *OsERF87* 遺伝子の共導入は 2.9K の発現を大きく増加させるが、これに *OsWRKY76* 遺伝子をさらに共導入するとその増加も強く抑制された。

(5) OsWRKY76 が *RSOsPR10* プロモーター領域内の W-box に結合するか検討するため、2.7~2.9 kbp 領域にある W-box 配列を用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果、W-box 配列に特異的な結合が見られ、変異を入れた W-box 配列には結合しなかった。

これらの結果から、*RSOsPR10* の JA による発現誘導には OsERF87 と OsERF1 の関与が示唆された。特に遺伝子上流 2.7~2.9 kbp 領域にある 4 つの GCC-box に変異を入れると誘導が減少することから、この領域の複数の GCC-box への結合を介して働く可能性が考えられた。一方で SA による誘導抑制については、OsWRKY76 が W-box に特異的に結合をすることで *RSOsPR10* の誘導抑制に働くことが示された。

今回の研究結果から *RSOsPR10* の発現制御機構の一端が明らかになってきたが、それらに加えて本論文では、イネにおける根特異的な JA/ET による誘導と SA による抑制の生物

学的な分子機構についても考察する。

Promoter analysis of root specific-stress responsive *RSOsPR10* gene in rice.

Takahiro Yamamoto (Laboratory of Plant Hormone Mechanisms)

Summary

Plant roots have important roles not only in absorption of water and nutrients, but also in stress tolerance. Plants cannot move on their habitat environment by themselves, so they are constantly exposed to a variety of biotic and abiotic stresses such as herbivory, pathogen attacks and environmental stresses. Therefore they have developed elaborate mechanisms to perceive external signals and to manifest adaptive responses with appropriate physiological changes. As one of the mechanisms, PR (Pathogenesis-Related) proteins have been well known to be induced by pathogen infection and act as some protect functions. The PR proteins are classified into 17 families based on amino acid sequence identity, small molecular masses and acidic pIs. It is considered that some of them involve in the defense mechanisms such as RNase activity and cell wall catabolic enzyme. However the accurate protein functions of many classes are not elucidated yet.

RSOsPR10 (Root Specific O*ryza* s*ativa* Pathogenesis-Related 10) has been identified as a root specific protein that is induced by biotic stress and abiotic stresses, such as salt, drought and wounding in rice at our laboratory. Transcripts and proteins of RSOsPR10 were significantly induced by exogenously applied jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) precursor 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid (ACC), while salicylic acid (SA) almost completely suppressed these inductions. Furthermore, the previous study suggested that OsERF1 is one of the putative transcriptional factors in the induction of *RSOsPR10*. On the other hand, Takao and Yoshida of our laboratory showed preliminary results indicating that OsWRKY76, one of the transcriptional factors in the SA pathway, is involved in the suppression of JA/ET induction of RSOsPR10. However, the regulation mechanisms and signaling pathway for *RSOsPR10* induction and suppression are still unclear.

In this study, in order to investigate the regulational mechanisms of *RSOsPR10* gene expression by JA and SA, I conducted promoter analysis using transient expression assay which was performed with rice roots by particle bombardment.

(1) To identify the region of the *RSOsPR10* promoter involving in the response to JA, I used a deletion series of of *RSOsPR10* promoter. Sequences corresponding to -4006, -3314, -2924, -2701 and -1895 bp upstream region from the translational start site (4K, 3.3K, 2.9K, 2.7K, 1.9K), were fused to the FLUC reporter gene. These five constructs were tested for their JA inductivity of the *RSOsPR10* promoter by introducing them

into wild-type rice roots using particle bombardment and subsequent treatment of the roots with or without JA for 12h. In the case of the *4K*, *3.3K* and *2.9K*, LUC activity was increased up to two fold over the mock with JA treatment, but *2.7K* LUC activity was reduced. These result suggested that the region from -2924 to -2701 bp contains *cis*-elements contributing to the responsiveness to JA. Then, to identify JA-responsive *cis*-elements in the *RSOsPR10* promoter, I researched GCC-box which is the putative binding site of ERF proteins and I found four GCC-box within -2924 to -2701 bp from the translational start site. In order to determine whether these four GCC-boxes are involved in the responsive to JA, I constructed a *2.9K* [G2-5mut] (four GCC-box were mutated). The responsiveness to JA in this construct was similar to that of the *2.7K* construct. This result indicated that GCC-boxes are important *cis*-elements to induce *RSOsPR10* gene by JA.

(2) To identify the activity of OsERF1 as a transcriptional regulator, I decided to measure *RSOsPR10* gene expression in the *ERF1* KD mutant line. *ERF1* KD showed that *RSOsPR10* gene expression was decreased, compared with wild-type plants. However the LUC activity was not affected when *35S::ERF1* was co-introduced with *2.9K* using dual LUC assay (FLUC/RLUC).

(3) To investigate some OsERFs other than OsERF1 as an inducer of *RSOsPR10*, I searched rice orthologues of Arabidopsis *ERF1* and *ORA59* which are known to the key regulator of JA/ET signaling pathway in Arabidopsis. First, I identified the OsERF83, OsERF87 and OsERF88 as a part of Arabidopsis *ERF1* and *ORA59* orthologues. Therefore, I analyzed involvement of these *ERF* genes by the effector assay. OsERF87 showed strong inducible activity on *2.9K* expression when *35S::ERF87* and *2.9K* were co-introduced. In contrast, the LUC activity was not affected when *35S::ERF83* (or *35S::ERF88*) was co-introduced with *2.9K*.

(4) To investigate the activity of OsWRKY76 as a transcriptional repressor, *2.9K* was introduced into the roots of WRKY76 OX and WRKY76 KO plants using particle bombardment. In the case of the WRKY76 KO, LUC activity was increased up to two fold after JA treatment similarity to wild-type but not in the WRKY76 OX. Furthermore, the LUC activity was suppressed when *35S::WRKY76* and *2.9K* were co-introduced in the effector assay.

(5) To determine the sequence specific DNA binding activity in vitro, OsWRKY76 was prepared as a fusion protein with MBP and tested for its binding activity by a gel mobility shift assay. WRKY76 bound to the W-box, but MBP control did not. Furthermore, OsWRKY76 did not bind to the mutated W-box with a single base

substitution. These results demonstrated that WRKY76 could bind to W-box in *RSOsPR10* promoter.

序論

植物は自ら生育環境を移動することはできない。その中で、植物の根は地上部を支えるとともに水分や栄養分を取り込む生育・生存に欠かせない器官であるだけでなく、土壌中の微生物との相互作用や環境ストレス応答にも重要な役割を担っている。また、乾燥や高温、低温、高塩など一般的な非生物ストレスは植物の成長や生産性に不利に働いている。これらストレスは植物にとって脅威であり、世界的にも穀物の収穫量減少といった問題を引き起こしている (Mahajan et al., 2005)。植物のストレス応答は複雑な過程で行われているため、ストレス応答の分子的な機構の解明は容易ではないが、近年、植物におけるストレス応答の情報伝達経路が徐々に明らかになってきている。植物を取り巻く病原感染、昆虫による食害、環境ストレスなど様々な生物学的あるいは非生物学的ストレスに対して、植物はこれらの外部シグナルを受容し、ストレスに適応するための形態的あるいは生理的な機構を精巧に発達させてきた。その中の 1 つとして植物の自己防御応答に関与している感染関連 (PR; Pathogenesis-Related) タンパク質がある。

このような植物の病傷害ストレス応答において植物ホルモンであるサリチル酸 (SA)、ジャスモン酸 (JA) およびエチレン (ET) が重要なシグナル伝達物質であることが報告されている (Raymond and Farmer 1998; Turner et al., 2002; Kazan et al., 2008; van Loon et al., 2006)。モデル植物であるシロイヌナズナを用いた研究から、病傷害に応答し誘導される SA を介したストレス応答の下流では、TGA や WRKY といった転写因子が働き、PR タンパクが誘導されるとともに全身獲得抵抗性 (SAR; Systemic Acquired Resistance) を示すことが知られている (Ryals et al., 1996; Mao et al., 2007)。また、SA シグナルの中心的な役割を果たす NPR1 (Nonexpressor of PR genes 1) タンパク質は、通常は細胞質中に存在するが SA に応答して核移行し、複数の TGA を介して *PR* 遺伝子や *WRKY* など下流の遺伝子群の発現を制御することが知られている (Kinkema et al., 2000; Spoel et al., 2009; Choi et al., 2010)。さらに最近、NPR1、あるいは NPR3 と NPR4 が、SA 受容体であることが報告され、SA 経路のより詳細な仕組みが明らかになりつつある (Wu et al., 2012; Fu et al., 2012)。一方、傷害や乾燥、高塩、病害などに応答して誘導される JA を介したストレス応答の下流では COI1、JAZs、MYC2 などの転写因子や情報伝達因子が働き、JA/ET シグナル経路では ERF (Ethylene Responsive Factor) 転写因子が *PR* 遺伝子を含む発現誘導に重要な役割を持っていることが明らかとなっている (Lorenzo et al., 2004; McGrath et al., 2005; Memelink., 2009)(参考図 1)。

植物の防御応答において、SA と JA/ET の複雑なクロストークの存在が知られている。これら植物ホルモンによる防御応答は JA 依存的な比較的軽微なストレスへの防御機構よりもより重篤な病傷害に関連する SA 依存的な防御機構が優先的に働くことが多い (Koornneef and pieterse., 2008; Verhage A et al., 2010)。シロイヌナズナにおいて、SA 処

理や SA 応答性の病原菌感染（生体栄養性; biotroph）によって JA シグナル応答が抑制され、JA 応答性の病原菌感染（死体栄養性; necrotroph）への感受性が高まる(Spoel et al., 2007)。また、*PDF1.2 (PLANT DIFENSIN 1.2)* といった JA 応答マーカー遺伝子は SA 処理により著しく抑制されることが知られている。SA を介した JA 応答性遺伝子発現の抑制はシロイヌナズナにおいて多く観察されることから、自然界において SA と JA のクロストークによる調節が防御応答に重要であることが示唆されている(Koornneef et al., 2008)。

ET も SA-JA クロストークの調節に関与することが明らかにされつつある(van Loon et al., 2006; Leon-Reyes et al., 2009, 2010)。多くの場合、ET と JA の相互作用は相乗作用を示す。植物特異的な転写因子の AP2/ERF スーパーファミリーである ERF1 と ORA59 (OCTADECANOID-RESPONSIVE *ARABIDOPSIS* 59)は、JA/ET シグナル経路を統合する主要な因子として見つかった(Lorenzo et al., 2003; Pre et al., 2008)。ERF1 と ORA59 の発現は JA や ET 単独処理で誘導され、同時処理で相乗的に誘導される。JA 非感受性として知られる *coi1-1* 変異体における ORA59 や ERF1 の過剰発現や、エチレン非感受性として知られる *ein2-1* 変異体における ERF1 の過剰発現は恒常的に *PDF1.2* 遺伝子発現を活性化したことから、これらの転写因子が JA/ET シグナル経路に重要な役割を果たしていることが示唆されている(Lorenzo et al., 2003; Pre et al., 2008)。また、ORA59 や ERF1 の発現は necrotroph への抵抗性を高める一方で、ORA59 をサイレンシングした植物では necrotroph への感受性が高まったことから AP2/ERF ファミリー転写因子が JA/ET を介した防御応答に重要な役割をしていることが考えられている(Berrocal-Lobo and Molina., 2004; Pre et al., 2008)。これらの SA と JA/ET の拮抗的な仕組みは、植物がストレス応答に対して用いるエネルギーのコストバランス調節をすることで複雑な自己防御機構を効率よく機能させていると考えられている (Verhage A et al., 2010; Thaler et al., 2012)。しかし、SA と JA/ET とのクロストークの分子機構について、未だ不明な点が多い。

イネにおいても SA と JA/ET のクロストークが報告されている(Vleesschauwer et al., 2013)。イネの OsNPR1(NH1)が SA の受容体であることの報告はまだないが、*OsNPR1* を過剰発現させたシロイヌナズナでは、SA 応答性の遺伝子が強く活性化され、同時に JA 応答マーカー遺伝子の抑制も観察された(Yuan et al., 2007)。さらに、*OsNPR1* アンチセンスイネでは昆虫摂食による JA 生合成遺伝子発現の増加や、JA 量の増加を示した(Li et al., 2013)。また、シロイヌナズナと同様に多くの WRKY 転写因子の関与も分かっている。例えば、病害応答や BTH 誘導性の転写因子 OsWRKY76 がファイトアレキシン生合成酵素をコードする遺伝子や複数の *PR* 遺伝子発現を抑制している(Yokotani et al., 2013)。特にイネの葉ではシロイヌナズナやタバコに比べ SA の内生量(約 10 µg/gFW)が 2 桁近く多いことから、イネでの内生 SA の役割に否定的なこともあり(Silverman et al., 1995)、SA 経路の役割や JA/ET の拮抗的な制御機構についても、その研究は不明な点が多く残されている。

上述したように、PR タンパク質は病原菌の感染に応答して合成されるタンパク質群の総

称であるが、病原菌の感染だけでなく傷害、乾燥、高塩ストレスでも誘導されることが知られている(van Loon et al., 2006)。アミノ酸の相同性や立体構造、血清学的な活性、生物学的な活性に基づいて現在 17 ファミリーに分類されている (Sinha et al., 2014)。PR-1 は SA や病原感染によって誘導され、一般に SAR の応答マーカーとして用いられる (Mitsuhara et al., 2008)。一方で PR-6 は JA/ET シグナル経路を介した傷害に応答して誘導され、プロテアーゼ阻害活性を示すことが知られている (Sels et al., 2008)が、PR タンパク質の多くはその機能が明らかとなっていない(参考表 1)。

PR10 ファミリーについては、主要な花粉アレルゲン Bet v1 が PR10 タンパク質として単離されて以来、新しいいくつかの知見が蓄積してきている (Hwang et al., 2008, Lebel et al., 2010; Lee et al., 2010; Xie et al., 2010; Hsu et al., 2014)。PR10 タンパク質の中でも、アミノ酸配列の相同性や細胞内局在、推定される機能に基づいて、リボヌクレアーゼと相同性を持つ IPR (intracellular pathogenesis-related protein) と NCS ((S)-norcoclaurine synthases) の特徴的な 2 つのグループに分類されている。PR タンパク質は多くの植物でその存在が報告されており、双子葉植物ではパセリ (Somssich et al., 1986)、シラカバ (Breiteneder et al., 1989)、ニンジン (Kim et al., 2014) など、単子葉植物ではユリ (Huang et al., 1997)、トウモロコシ (Xie et al., 2010)、コムギ (Haque et al., 2014) など知られている。これらの PR10 タンパク質はマルチジーンファミリーを形成しており、少なくともエンドウでは 5 つ、イネで 4 つ、ブドウで 17 あることが知られている。PR10 タンパク質の IPR グループは 151-162 アミノ酸で 15-18 kDa と低分子の酸性タンパク質であり、シグナルペプチドを持たず、保存された 3 次元構造と細胞質局在を示すという共通した特徴を持っている (Agarwal and Agarwal., 2014)。イネの PR10 タンパク質としては、プロベナゾール誘導性の PBZ1 (OsPR10a/PBZ1) が最初に単離された (Midoh and Iwata., 1996)。その後、*OsPR10a* と相同性の高いイネの *PR10* 遺伝子として *OsPR10b*, *OsPR10c* (McGee et al., 2001) や、いもち病菌感染、傷害および JA、SA 処理により誘導される PR10 として JIOsPR10 が報告されている (Jwa et al., 2001; Kim et al., 2008)。OsPR10a/PBZ1 の転写レベルでの発現は主に地上部で、植物ホルモンである JA、ABA、SA によって誘導されることが報告されている (Moons et al., 1997; Lee et al., 2001; McGee et al., 2001; Hwang et al., 2008)。しかしながら、*OsPR10a/PBZ1* を含むイネの OsPR10 の情報伝達経路、および防御応答への生理学的な活性や機能は未だ明らかとなっていない。

RSOsPR10 (Root Specific *Oryza sativa* Pathogenesis-Related 10) は、当研究室でのイネの根におけるプロテオーム解析において、塩や乾燥処理により発現が根特異的に誘導されるタンパク質として単離された PR タンパク質である (Hashimoto et al., 2004)。RSOsPR10 は、160 アミノ酸からなる酸性 (pI 4.74) の PR タンパク質であり、アミノ酸配列は OsPR10a/PBZ1 に 66% と高い相同性を示した。その後、塩や乾燥、傷害といったストレス処理の他にもいもち病菌、JA や ET 処理によって根特異的な発現が観察される一方で、低

温ストレスや ABA、SA では誘導されないことが転写レベルで明らかにされた (Hashimoto et al., 2004)。タンパク質レベルにおいても特異的抗体を用いた実験から *RSOsPR10* の誘導および蓄積が、塩、乾燥、傷害といったストレス処理や JA により根特異的に誘導されることが確認された。また、免疫組織化学的観察から、塩や乾燥、JA 処理後、根の維管束組織を取り囲む内皮や皮層細胞に大量に蓄積することも明らかになった (Takeuchi et al., 2011) (参考図 2)。また、*RSOsPR10* を過剰発現する形質転換イネとシバを(独)生物資源研究所および北興化学工業(株)との共同研究で作出し、ストレス耐性評価が行われた。その結果、過剰発現イネ、シバともに野生型と比較して高い乾燥耐性がみられ、形質転換シバにおいては高い耐塩性も観察された (参考図 3)。さらに形質転換イネでは根数、根重の増加が確認された (参考図 4)。これらの結果から、*RSOsPR10* がイネの根の成長促進を含めた植物の環境ストレス耐性付与に重要な役割を担っている可能性が示され、悪環境下でも生育可能な耐性植物の開発にも応用出来ると期待されている (特許第 8731048 号)。

こうした研究と平行して、*RSOsPR10* 遺伝子発現の情報伝達経路の解析が進められてきた。*RSOsPR10* の根特異的な発現は、塩、乾燥、傷害などのストレス刺激受容後、JA や ET を介して JA/ET 経路によって誘導され、その誘導 SA によってほぼ完全に抑制されることが転写レベルおよび翻訳レベルで明らかにされている (参考図 5)。この *RSOsPR10* の発現誘導に ET および JA 応答性の転写因子である OsERF1 が JA/ET 経路の下流で関与している可能性が示された (Takeuchi et al., 2011) (参考図 6)。また、病害応答関連の転写因子である OsWRKY76 の過剰発現体における *RSOsPR10* の JA 応答性が、野生型イネと比較して有意に抑制されたことから、SA 処理による *RSOsPR10* の発現誘導抑制に OsWRKY76 の関与する可能性が示唆されている (吉田悠里、修士論文、2013) (参考図 7)。*RSOsPR10* のプロモーター上流領域には ERF が結合する可能性のあるシス配列 GCC-box を始め、エリシター応答性 bZIP 型転写因子 TGA の認識配列 TGACG-motif、ジャスモン酸応答性 bHLH 型転写因子結合配列 E-box、病傷害応答全般の因子 WRKY の結合配列 W-box などが複数存在することが明らかとなっている (参考表 2)。また、*RSOsPR10* 遺伝子上流 0.6 kb および 1.9 kb を GFP レポーターに繋いだコンストラクトを導入した形質転換イネでは地上部および地下部での GFP シグナルの強度に変化はなく、根特異的な発現、ストレス応答といった *RSOsPR10* の発現制御に関わる領域は 2 kb よりも上流にあると考えられている (富永真規子、修士論文、2011)。さらにプロモーター上流の発現制御領域を検討するため、遺伝子上流 1.9 kb, 2.9 kb, 4 kb を GUS レポーターに繋いだコンストラクトを導入した形質転換イネを用いて解析したところ、JA や ACC により *1.9K* では根特異的な応答性がほとんどみられないのに対し、*2.9K* および *4K* では根特異的な応答性がみられることから *RSOsPR10* の発現を制御する主要なプロモーター領域が 1.9~2.9 kb の間に存在することが示唆されている (参考図 8)。しかし、生体内での情報伝達経路における転写因子や主要なシス配列など、*RSOsPR10* の発現制御機構の詳細は未だ明らかとされていない。

本研究では、JA による誘導と SA により抑制される発現制御機構の詳細な検討を進めるため、*RSOsPR10* プロモーター領域の長さを変えた LUC レポーターコンストラクトを作成し、それらを particle bombardment 法によりイネ根における一過的発現系を確立することで、プロモーター解析を進めた。この手法により、主要なシス配列に変異挿入をすることで発現制御に関与するシス配列の特定も行った。さらに発現制御に関与する転写因子特定のため、各変異体を用いた解析から JA と SA の拮抗的なクロストークにどのような因子が関与するのかを調べた。

材料および方法

1. 植物材料

1-1. 野生型イネ

イネ (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) の種子は、(独) 農業生物資源研究所 矢野昌裕博士より分与されたもの当大学で栽培し、使用した。

1-2. OsWRKY76 形質転換体

OsWRKY76 過剰発現イネ (*WRKY76* OX) の種子は、(独) 農業生物資源研究所 南栄一博士より分与されたものを使用した。OsWRKY76 ノックアウトイネ (*WRKY76* KO) の種子は、(独) 農業生物資源研究所 西澤洋子博士より分与されたものを使用した。これらのバックグラウンドはいずれも日本晴 (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) である。

1-3. OsERF1 T-DNA 挿入変異体

OsERF1 T-DNA 挿入変異体イネの種子は韓国の POSTECH より取り寄せたものを使用した(Yi and An., 2013)。このバックグラウンドはジャポニカ種の Dongjin である。

2. イネの生育方法

2-1. 種子の滅菌

籾すり器を用いてもみ殻を取り除いた種子を 50 ml チューブに入れ、70%エタノール中で 3 分間振盪させた。その後、1%アンチホルミン中で 40 分間振盪させて滅菌し、滅菌水で 3 回以上の洗浄をした。

2-2. 播種・生育

滅菌した種子を寒天培地上に播種し、インキュベーター (日本医科器械製作所 BIOTRON LH300)、27°C、暗期 12 時間、明期 12 時間サイクル (約 65.4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) で播種後 4 日まで静置させた。培地は 70%エタノールで消毒したプラスチックポットに 0.3%寒天培地 (Wako 植物培地用 Agar) を 300 ml ずつ分注し、固めたものを使用した。その後、水道水の入った容器に浮かべたトレーの穴にイネを 1 つずつ浮かせ、2 日毎に水道水を交換しながら播種後 9 日目まで生育させた。

3. 遺伝子型の確認

3-1. ゲノム DNA 抽出

葉の一部 (播種後 5~8 日目イネ葉 先端 2~5 mm) をステンレスビーズ (直径 4.8 mm) 2 粒入りの 2 ml マイクロチューブ (SARSTEDT) に回収し、TPS buffer (0.1 M Tris-HCl

(pH8.0), 10 mM EDTA (pH8.0), 1 M KCl) 200 μ l を加え、Micro Smash (トミーメディコ MS-100R) で破碎した。その後、15,000 rpm、室温、5 分間遠心した。上清 150 μ l を新しいエッペンドルフチューブに移し、2-プロパノール 150 μ l を添加しボルテックスした後、5 分間室温で静置し、15,000 rpm、室温、10 分間遠心した。上清を捨てた後、沈殿物を撹拌させないようにしながら 70% エタノールを 200 μ l 添加し、15,000 rpm、室温、5 分間遠心した。上清を捨てた後、室温で 10 分間乾燥させ、TE buffer 50 μ l を加えボルテックスして溶解した。

3-2. ゲノム PCR

ゲノム PCR は葉から抽出したイネゲノム DNA を鋳型にし、*TaKaRa Ex Taq*TM (TaKaRa) を用いて行った。PCR 条件は以下の通りである。

1. Initial activation:95°C, 5 分 2. Denaturation:98°C 10 秒 3. Annealing:55°C 30 秒
4. Extension:72°C 1 分 5. Final extension:72°C 7 分で 2 から 4 のステップを 35 サイクル行った。反応後の PCR 産物は 7 μ l ずつ 1.5% アガロースゲルで電気泳動を行った。なお、プライマーは以下を使用した。

OsERF1 T-DNA forward-1 primer 5'-AGCATGGTTTTGTACAGGGAAATG-3'

OsERF1 T-DNA reverse-1 primer 5'-TCTGTGACCTGCCAACTCTGG-3'

T-DNA vector primer 5'-CCACAGTTTTTCGCGATCCAGACTG-3'

4, 植物ホルモンによる *RSOsPR10* の発現誘導処理

4-1. 処理方法

播種後 9 日目のイネと水道水 35 ml が入った試験管に以下の処理を行った。なお、処理は 12 時間浸漬処理[ジャスモン酸(JA)、ジャスモン酸(JA)とサリチル酸(SA)、サリチル酸(SA)]を行った。

4-2. JA 処理

100% エタノールで 0.1 M の JA (SIGMA) ストック溶液を調整し、そこから試験管へ 35 μ l を加えて、処理液の終濃度を 100 μ M とした。この時の溶液の pH は 6.37 であった。

4-3. JA と SA 同時処理

0.1 M JA 35 μ l とエタノールで調整した 0.1 M SA (WAKO) ストック溶液 35 μ l を加え、終濃度 100 μ M とした。この時の溶液の pH は 6.42 であった。

5. qRT-PCR (quantitative Reverse transcriptional-PCR)

5-1. RNA 抽出

液体窒素で凍結した試料（イネ 1 個体分 約 30~200 mg）を滅菌した 2 mL チューブ（SARSTEDT）にステンレスビーズ（直径 4.8 mm）2 粒加え、Micro Smash™ MS100-R（トミーメディコ）で 3,000 rpm、15 秒を 2 回行い、破碎した。そこへ TRIzol Reagent（life technology）を 1 ml 添加し、ボルテックスで溶解させながら懸濁した。遠心機にサンプルチューブをセットし、12,000 rpm、10 分、4℃で遠心分離した後、新しい 1.5 ml エッペンドルフチューブに上清のみを回収した。回収した上清にクロロホルム（Wako）を 200 µl 加え、ボルテックスで攪拌し、2 分間静置させた後、12,000 rpm、15 分、4℃で遠心分離を行い、上清を回収した。回収した上清に 2-プロパノール（Wako）を 500 µl 加え、手で緩やかに攪拌し、10 分間静置させた。15,000 rpm、15 分、4℃で遠心分離を行い、上清を廃棄した後、70%エタノールでチューブの壁を洗い流すようにリンスした。15,000 rpm、5 分、4℃で遠心分離を行い、上清はピペットマンを用いて完全に取り除いた。チューブの蓋を開き、逆さまにした状態で 10 分間乾燥させた後、RNA グレードの滅菌水（DDW）45 µl を加え、THERMO ALUMI BATH（IWAKI）で 58℃、3 分間温め、よく溶解させた。

DNAase 処理には RNase-Free DNase Set（QIAGEN）を用いて行った。抽出 RNA を 44 µl、RDD Buffer を 10 µl、DNase を 2.5 µl 加え、全量が 100 µl になるように滅菌水を加え、10 分間室温で静置させた。さらに滅菌水を 100 µl 加えた後、フェノールクロロホルムを 200 µl 加え、ボルテックスで懸濁した。10,000 rpm、5 分、室温で遠心分離を行い、新しいチューブに上清を回収した。回収サンプル約 200 µl に対して 3M 酢酸ナトリウムを 20 µl 加え攪拌した後、100%エタノールを 500 µl 加えて混ぜ合わせた。-80℃で 20 分以上置き、その後、12,000 rpm、15 分、4℃で遠心分離を行い、上清を捨てた。200 µl の 70%エタノールで壁を洗い流すようにリンスした後、15,000 rpm、5 分、4℃で遠心分離をした。上清をピペットマンを用いて丁寧に取り除き、チューブの蓋を開き逆さまにした状態で 10 分間乾燥させた後、RNA グレードの滅菌水 27 µl を加え THERMO ALUMI BATH で 58℃、3 分間温め、よく溶解させた。この溶液を RNA 抽出液とし、Thermo Scientific NanoDrop 2000c 超微量分光光度計を用いて RNA の定量を行った。

5-2. 逆転写

逆転写には High Capacity RNA-to-cDNA Kit（Applied Biosystems）を使用した。チューブに 0.5 µg の total RNA と 20×Enzyme Mix 0.5 µl、2×RT Buffer 5 µl を加え、全量が 10 µl となるように滅菌水を加えた。チューブを PCR Thermal Cycler（TaKaRa）にセットし、37℃ 60 分、95℃ 5 分で反応させ、cDNA 合成を行った。

5-3. 定量 PCR 反応

cDNA を 30 倍希釈し、SYBR Green I Master Mix（Roche Diagnostics）を用いて、LightCycler 480（Roche Diagnostics）で定量を行った。96 穴プレートにそれぞれ、プライ

マー mixture 2 µl、cDNA 溶液 3 µl、Master Mix 5 µl の計 10 µl を入れ行った。リファレンスには UBQ (*ubiquitin*) を用いた。なお、プライマーは以下を使用した。

RSOsPR10 forward primer 5'-ATGAAGCTCAACCCTGCTGT-3'

RSOsPR10 reverse primer 5'-TGAGCTTGCCACCTTACTT-3'

OsERF1 forward primer 5'-CAGTGAAGCAAGCAAACCAA-3'

OsERF1 reverse primer 5'-GCTTATCGCGTTTGCAATTT-3'

UBQ forward primer 5'-TCCGTGGTGGTCAGTAATCA-3'

UBQ reverse primer 5'-ACTGCTGTCCCACAGGAAAC-3'

6. 一過的発現系の解析

6-1. 35S::GFP コンストラクト

35S::GFP コンストラクトは丹羽康夫博士（静岡県立大学）より分与して頂いたものを使用した(Chiu et al., 1996)。

6-2. *RSOsPR10* 遺伝子上流 1.9, 2.7, 2.9, 3.3, 4kb::LUC コンストラクト

RSOsPR10 遺伝子上流プロモーター領域を LUC に繋いだコンストラクトは富永真規子（平成 23 年度修士卒）および行田敦子（元客員研究員）から分与して頂いたものを使用した。

6-3. 2.9K [*G2-5mut*], 2.9K [*W2 mut*]コンストラクトの作製

2.9K[*G2-5mut*]、2.9K[*W2mut*] コンストラクト作製には PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa) と KOD-Plus[®] Mutagenesis Kit (TOYOBO) を組み合わせて用いた。2.9K コンストラクトを鋳型にし、鋳型であるターゲット領域を含むプラスミド DNA と変異導入用プライマーを用いて PCR をすることで変異導入をした。PCR には 2×PrimeSTAR Premix 12.5 µl、Primer Mix (each 5µM) 1.5 µl、Template plasmid DNA 0.5 µl、滅菌水 10.5 µl を混合し、1. 98°C 10 秒、2. 55°C 5 秒、3. 72°C 40 秒 (5 秒/kb) を 10 サイクル（もしくは 20 サイクル）した。変異導入用プライマーは以下を使用した。

GCCmut1 forward primer 5'-CAGCGGAGGAACACCTAGTAGCCGGATC-3'

GCCmut1 reverse primer 5'-GGTGTTCCCTCCGCTGGGCACCGTTGCA-3'

GCCmut2 forward primer 5'-TCGAGGAGGAGGTGCGCAGGCGGATCGA-3'

GCCmut2 reverse primer 5'-GCACCTCCTCCTCGATCCGGCTACTAG-3'

GCCmut3 forward primer 5'-GCTCGGAGGAGGTTAGATCAGAGGCGAG-3'

GCCmut3 reverse primer 5'-TAACCTCCTCCGAGCATGGCATCCTCC-3'

GCCmut4 forward primer 5'-CGGGAGGAGGAGGTGTGATGTGCGAGCAG-3'

GCCmut4 reverse primer 5'-CACTCCTCCTCCCGACGGATCCAGAGCT-3'

GCCmut5 forward primer 5'-CCTCTTTTGTCTCCAGCGCAAATTAT-3'

GCCmut5 reverse primer 5'-CGCTGGAGGACAAAAGAGGTTTTCTTTG-3'

得られた PCR 産物 12.5 μ l に Dpn I 0.5 μ l を混ぜた後、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、試料をアガロースゲル電気泳動し、目的の長さのバンドが見られるか確認をした。

6-4. プラスミド精製

プラスミドを増幅するため、competent cell DH5 α (TOYOBO) 50 μ l にプラスミドサンプル 1 μ l を加え、氷上で 20 分インキュベートした後、THERMO ALUMI BATH を用いて 42°C 30 秒のヒートショックを与え、形質転換した。2 分間氷上で静置後、SOC 培地 0.5 ml を添加し、37°C 1 時間インキュベートした。アンピシリン (100 μ g/ml) を含む LB 寒天培地に塗布し、37°C でオーバーナイトした。翌日、コロニーをピックし、2 ml LB 液体培地 (アンピシリン 100 μ g/ml 含む) で液体培養を 37°C で一晩行なった。翌日、培養液をエッペンドルフチューブに入れ、15,000 rpm、5 分、4°C で遠心分離し、上清を取り除いた。集菌した大腸菌から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド精製を行なった。

7. particle bombardment 法による遺伝子導入

7-1 金粒子の準備

金粒子 60 mg (100 発打ち込み分) と 1 ml の 100%エタノールをマイクロチューブ (SARSTEDT) に加え、ボルテックスを十分かけた後に、15,000 rpm、30 秒、室温で遠心分離した。上清を捨て、70%エタノールを 1 ml 加え、ボルテックスを十分かけた後に、15,000 rpm、30 秒、室温で遠心分離した。上清を捨て、滅菌水 1 ml を加えてボルテックスをしっかりとかけた後に、15,000 rpm、30 秒、室温で遠心分離した。上清を捨て、滅菌水 1 ml を加え、4°C 保存した。

7-2. 金粒子への DNA の固着

打ち込み 1 発に対して準備した金粒子 10 μ l (ボルテックスしてよく混ぜたもの)、plasmid LUC : 1 μ g、インターナルコントロール (pRL vector) plasmid : 0.5 μ g をエッペンチューブ内で混合し、等量の 2.5 M CaCl_2 を加え、ボルテックスを 2 分かけた。全体量の 1/5 の 0.1 M スペルミジンを加え、ボルテックスを 2 分間かけた後に 15,000 rpm 30 秒 4°C で遠心分離した。上清を捨て、70%エタノールを全体の 2 倍量以上加え、ボルテックスを 2 分間かけた後に 15,000 rpm 30 秒 4°C で遠心した。上清を捨て、100%エタノールを全体の 2 倍量以上加え、ボルテックスを 2 分間かけた後に、15,000 rpm、30 秒、4°C で遠心した。上清を捨て、100%エタノール 10 μ l (×打ち込み回数分) を加え、ボルテックスをしっかりとかけた。

7-3. マクロキャリアへの金粒子の付着

プラスチックシャーレにマクロキャリアとストップスクリーンを打ち込み回数分だけ取り出し、別のシャーレに分注した 100%エタノールにそれぞれ浸漬滅菌した。プラスチックシャーレを打ち込む種類分の個数を用意し、それぞれに濾紙を敷いた。100%エタノールで洗ったマクロキャリアを各シャーレに打ち込み回数分を濾紙に並べ、エタノールを完全に蒸発させた。事前に準備していた DNA 固着済の金粒子が入ったエッペンチューブをボルテックスし、ピペッティングを繰り返すことでよく懸濁し、その状態を保ちながら乾いたマクロキャリアにそれぞれの金粒子を 8 μ l ずつ、ピペットマンで付着させてよく乾かした。

7-4. 打ち込み用イネの準備

生育 9 日目のイネを、寒天培地を入れたシャーレ上に根を折りたたむようにしてセットした。この時、イネの根の折りたたまれる位置が金粒子の打ち込まれる範囲にすることで導入効率をあげるようにした。

7-5. 打ち込み用葉の準備

生育 9 日目のイネの第 2 葉を切断し、24 時間 水に浮かべて静置させた。この処理を施すことで、切断による傷害ストレスを除いた。その後の方法は根と同様である。

7-6. イネの根への金粒子打ち込み

パーティクルガンはバイオリスティック PDS-1000/He(Bio-Rad)を使用した。ガスの圧力は 1100 Psi (約 9 MPa) に合わせ、真空ポンプの電源を入れた。ラプチャーディスクホルダーに、ラプチャー(1100 Psi)をはめこみ固定した。DNA 付着金粒子を固着させたマクロキャリアをマクロキャリアホルダーに赤いキャップでしっかりと固定させた。パーティクルガン本体の 1 段目にストップリングスクリーン、マクロキャリアの順にセットし、上から 3 段目に寒天培地シャーレを置き、その上にイネを乗せた。本体の扉を閉め、内部を真空状態に、真空圧 27~28 Hg、ゲージ 1100 Psi 時に金粒子を打ち込んだ。導入効率をあげるため、1 つのイネに対して 2 発の金粒子を打ち込んだ。2 発目を打ち込む際には、試料の打ち込んだ側とは反対側に面が上になるように工夫して、打ち込んだ。1 発目と 2 発目は間隔を開けずに打ち込んだ。

7-7. 植物ホルモンによる LUC の発現誘導処理

パーティクルガンによる遺伝子導入後のイネは素早く各ホルモン処理液 35 ml の入った試験管内に浸漬処理し、インキュベーター(日本医科器械製作所 BIOTRON LH300) 27°C、暗条件下で 12 時間インキュベートした。

7-8. サンプルリング

イネの根のみをハサミで切断し、2 ml チューブに回収した後、液体窒素中で凍結させた。

7-9. タマネギ表皮細胞を用いた局在解析

市販のタマネギの 2 層目および 3 層目の鱗片にパーティクルガンにより 7-5 と同条件で打ち込み後、試料を乾燥させないように保湿したプラスチック容器に入れ、暗条件下で一晩静置した。翌日、OLYMPUS IX71 顕微鏡を用いて GFP の蛍光を観察した。

8. LUC 活性測定

8-1. LUC 活性測定のサンプル準備

LUC 活性測定には Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて行った。液体窒素で凍結した試料を滅菌した 2 mL チューブ(SARSTEDT) にステンレスビーズ (直径 4.8 mm) 2 粒加え、Micro Smash™ MS100-R (トミーメディコ)で 3,000 rpm、10 秒を 2 回行い、破碎した。そこに 200 μ l の Lysis Buffer 5 倍希釈液を加え、再度 Micro Smash で 3,000 rpm、10 秒行い、試料と Lysis Buffer をよく混合させた。14,000 rpm、20 分、4℃ で遠心分離を行い、上清 60 μ l を新しいエッペンドルフチューブに移した。

8-2. LUC 活性測定

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) と GLOMAX 20/20 LUMINOMETER (Promega) を用いて活性測定をした。測定用チューブ(WATSON) に LAR II を 50 μ l ずつ分注し、サンプル 10 μ l を入れてピペッティングで攪拌し、firefly luciferase(FLUC)活性を測定する。測定後、Stop&Glo reagent を 50 μ l 入れてボルテックスし、renilla luciferase(RLUC)活性を測定した。LUC 活性は FLUC/RLUC の比率で表示し、かつ、導入効率の高い(RLUC 活性値が 20,000 以上)データを使用した。

9. エフェクターコンストラクトの作製 (35S::ERF1, ERF83, ERF88)

9-1. 35S::WRKY76 コンストラクト

35S::WRKY76 コンストラクトは(独)農業生物資源研究所 横谷尚起博士より分与されたものを使用した (Yokotani et al., 2013)。ベクターは埼玉大学 高木優博士より許可を得て使用した。

9-2. ERF1 CDS 断片増幅

RAP-DB (The Rice Annotation Project Database) より OsERF1 (Os04g0546800)、OsERF83 (Os03g0860100)、OsERF88 (Os03g0150200)の CDS 配列を検索した。イネの

根から得られた cDNA を鋳型とし、Prime STAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて PCR を行った。PCR 条件は以下の通りである。

1. Initial activation: 98°C 1 秒、2. Denaturation: 98°C 10 秒 3. Annealing: 55°C 15 秒 4. Extension: 68°C 1 分(1 分/kb) で 2 から 4 のステップを 30 サイクルで行った。なお、プライマーは以下を使用した。

ERF1 forward primer 5'-TCTAGATGACGGCGCGAAGCATG-3'

ERF1 reverse primer 5'-GAGCTCTTAGATGACGAGCTGCTCCACG-3'

ERF83 forward primer 5'-TCTAGATGCATTGCTGCATGTCGCT-3'

ERF83 reverse primer 5'-GAGCTCTCAGATGGAGTGGTGGCTTGG-3'

ERF88 forward primer 5'-TCTAGATGGAGGACGACAAGAGTAAGGAG-3'

ERF88 reverse primer 5'-GAGCTCCTAGTAGTTCTTATCACGATAGTTGGTCT-3'

9-3. PCR 産物の精製

PCR 産物約 22 µl を 3%のアガロースゲルで電気泳動し、目的のバンドをゲル切り出しした。切り出したゲルから PCR 産物を QIA quick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。

9-4. サブクローニング

生成した PCR 産物を 10×A-attachment mix (TOYOBO) を用いて A-tail 付加を行った。その後、A-tail が付加された PCR 産物 1.5 µl に、2×T4 Ligase 2.5 µl、pGEM-T easy Vector (QIAGEN) 0.5 µl、T4 DNA Ligase 0.5 µl を加え、4°C オーバーナイトでライゲーションを行った。翌日、ライゲーションサンプル 1 µl に対して competent cell DH5α(TOYOBO) を 50 µl 加え、氷上で 5 分インキュベートした後、42°C 30 秒のヒートショックを与え形質転換した。SOC 培地 450 µl 加え 37°C 1 時間インキュベートした後、LB+アンピシリン(100 µg/ml)培地に培養した産物を 50 µl と 300 µl ずつ、X-Gal (50 mg/ml) 50µl、0.1M IPTG 50 µl と同時にまき、SOFT INCUBATOR SLI-600D (EYELA) で 37°C オーバーナイトした。

9-5. コロニーPCR

pGEM-T easy Vector 内の lacZ によるブルーホワイトセクションにより白いコロニーのみをピックし、Prime STAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を用いてコロニーPCRを行った。PCR 条件は以下の通りである。

1. Initial activation: 98°C 1 秒、2. Denaturation: 98°C 10 秒 3. Annealing: 55°C 15 秒 4. Extension: 68°C 1 分(1 分/kb) で 2 から 4 のステップを 35 サイクルで行った。なお、プライマーは以下を使用した。

OsERF1 forward primer 5'-TCTAGATGACGGCGCGAAGCATG-3'

OsERF1 reverse primer 5'-GAGCTCTTAGATGACGAGCTGCTCCACG-3'

OsERF83 forward primer 5'-TCTAGATGCATTGCTGCATGTCGCT-3'

OsERF83 reverse primer 5'-GAGCTCTCAGATGGAGTGGTGGCTTGG-3'

OsERF88 forward primer 5'-TCTAGATGGAGGACGACAAGAGTAAGGAG-3'

OsERF88 reverse primer 5'-GAGCTCCTAGTAGTTCTTATCACGATAGTTGGTCT-3'

9-6. プラスミド精製

インサートが確認できた大腸菌はアンピシリンを含む 2 ml LB 液体培地で一晚培養後、菌液 2 ml をエッペンドルフチューブに入れ、15,000 rpm, 5 分, 4℃で遠心分離し集菌した。集菌した大腸菌から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いてプラスミド精製を行った。

9-7. シークエンス

インサートの配列決定のためのシークエンスは (株) マクロジェン・ジャパンに外注し、塩基配列決定を行った。シークエンスに用いたプライマーは以下の通りである。

SP6 5'- ATTTAGGTGACACTATAG-3'

T7promoter 5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3'

9-8. 制限酵素処理

シークエンス解析からインサートが正しく挿入されたプラスミドと 35Spro::WRKY76 コンストラクトを制限酵素処理した。制限酵素は Sac I と Xba I を用いた。プラスミド 1 µl に対して 10×M buffer 2 µl、Sac I 0.5 µl、滅菌水 16 µl を加えた。その後、37℃ 1 時間インキュベートし、反応後の産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い目的断片の精製を行った。精製のプロトコルは上述と同様である。

9-9. プラスミド精製

一過的発現系に用いるプラスミドを大量に精製するため、形質転換した大腸菌はアンピシリンを含む 250 ml の LB 液体培地で一晚培養後、集菌した。集菌した大腸菌を Plasmid Plus Midi Kit (QIAGEN)を用いてプラスミド精製を行った。

10. エフェクターコンストラクトの作製 (35S::ERF87)

OsERF87 (Os09g0572000)CDS 配列内には sac I 制限酵素サイトが存在することから、GATEWAY Cloning (Life Technologies) を用いてクローニングした。

10-1. ERF87 CDS 断片増幅

RAP-DB (The Rice Annotation Project Database) より OsERF87 (Os09g0572000)の

CDS 配列を検索した。イネの根から得られた cDNA を鋳型とし、Prime STAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて PCR を行った。PCR 条件は以下の通りである。

1. Initial activation: 98°C 1 秒、2. Denaturation: 98°C 10 秒 3. Annealing: 55°C 15 秒 4. Extension: 68°C 1 分(1 分/kb) で 2 から 4 のステップを 30 サイクルで行った。なお、プライマーは以下を使用した。

OsERF87 forward primer

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAGGATTGGCAATGACGATTTG-3'

OsERF87 reverse primer

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAGGATTGGCAATGACGATTTG-3'

10-2. PCR 産物の精製

PCR 産物約 22 µl を 3%のアガロースゲルで電気泳動し、目的のバンドをゲル切り出した。切り出したゲルから PCR 産物を QIA quick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。

10-3. エントリーベクターへの組み換え

GATEWAY Technology (invitrogen) のプロトコルに従い行った。精製断片 10.4 µl と pDONR™/Zeo 1.6 µl、5×BP clonase Reaction Buffer 4 µl を混合した後、4 µl の BP clonase enzyme mix を 2 秒、2 回ボルテックスした。25°C, 1 時間インキュベート後、半量 (10 µl) に 1 µl Proteinase K solution を加え、37°C で 10 分インキュベートした。その後、DH5α 50 µl に 1 µl のサンプルを加え、形質転換した。

10-4. コロニーPCR

Prime STAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を用いてコロニーPCR を行った。PCR 条件は以下の通りである。

1. Initial activation: 98°C 1 秒、2. Denaturation: 98°C 10 秒 3. Annealing: 55°C 15 秒 4. Extension: 68°C 1 分(1 分/kb) で 2 から 4 のステップを 35 サイクルで行った。なお、プライマーは以下を使用した。

OsERF87 forward primer

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAGGATTGGCAATGACGATTTG-3'

OsERF87 reverse primer

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAGGATTGGCAATGACGATTTG-3'

10-5. プラスミド精製

インサートが確認できた大腸菌を 2 ml LB 液体培地+ゼオシン(25 mg/ml) で一晩培養後、菌液 2 ml をエッペンドルフチューブに入れ、15,000 rpm, 5 分, 4℃で遠心分離し集菌した。集菌した大腸菌から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いてプラスミド精製を行った。

10-6. シークエンス

インサートの配列決定のためのシークエンスは (株) マクロジェン・ジャパンに外注し、塩基配列決定を行った。シークエンスに用いたプライマーは以下の通りである。

SP6 5'- ATTTAGGTGACACTATAG-3'

10-7. デスティネーションベクターへの組み換え

エントリーベクターに組み込まれた ERF87 をデスティネーションベクター (pGWB502) に組み換えた。両者のベクターと 5×LR clonase reaction buffer 4 µl、TE buffer (up to 16 µl) を混合した後、LR clonase enzyme 4 µl を加え 2 秒、2 回ボルテックスした。25℃1 時間インキュベートした後、半量 (10µl) に 1 µl の Protein K solution を加え 37℃10 分インキュベートした。その後、DH5α 50 µl に 1 µl のサンプルを加え、形質転換した。プレートはスペクチノマイシン (50 mg/ml) 入りを使用した。

10-8. プラスミド精製

一過的発現系に用いるプラスミドを大量に精製するため、形質転換した大腸菌を 35 ml の LB 液体培地 (スペクチノマイシンを含む) で一晩培養後、集菌した。集菌した大腸菌を Plasmid Plus Midi Kit (QIAGEN)を用いてプラスミド精製を行った。

10-9. 35S::ERF87-GFP コンストラクト作成

10-6 までで作成したエントリーベクターをデスティネーションベクター (pGW505) に 10-7 と同様にして組み換えた。プラスミド精製も 10-8 と同様にして行った。

11. ゲルシフトアッセイ

11-1. プローブの作製

RSOsPR10 遺伝子上流 2.7 kb 付近にある W-box 配列を中心にオリゴ DNA を設計し、プローブとした。設計した配列は以下の通りである。

W-box forward 5'-GTACAGCGACGATAGGTCAAGGCGGTGGAG-3'

W-box reverse 5'-TCGACTCCACCGCCTTGACCTATCGTCGCT-3'

W-box m1 forward 5'-GTACAGCGACGATAGTTCAAGGCGGTGGAG-3'

W-box m1 reverse 5'-TCGACTCCACCGCCTTGAACCTATCGTCGCT-3'

W-box m2 forward 5'-GTACAGCGACGATAGTAGGAGGCGGTGGAG-3'

W-box m2 reverse 5'-TCGACTCCACCGCCTCCTACTATCGTCGCT-3'

その後、DIG Gel Shift Kit 2nd generation (Roche Diagnostics GmbH) を用いてプロトコルに従い、プローブを作製した。

11-2. タンパク精製

MBP および OsWRKY76-MBP リコンビナントタンパク質は（独）農業生物資源研究所横谷尚起博士より分与して頂いたものを使用した。なお、リコンビナントタンパク質は OsWRKY76 CDS 配列を *Bam*HI と *Hind*III で消化した pMALc2x ベクターに組み込み、コンピテントセル(JM109)で形質転換し、アミロースレジン(New England Biolabs)で精製した。

11-3. DNA-タンパク結合反応

5×結合バッファー 4 µl、Poly[d(I-C)]1 µl、Poly L-lysine 1 µl、MBP 0.3 µl(750 ng/µl) または MBP-OsWRKY76 0.5 µl(450 ng/µl)、DIG ラベルプローブ 2 µl(15.5 µM)、滅菌水を最終量が 20 µl となるように加え、室温で 15 分インキュベートした。

11-4. 電気泳動とブロッティング

DNA-タンパク結合反応液 20 µl を 10%アクリルアミドゲル(e-PAGEL ATTO)で電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルの上にメンブレン(Hybond-N+)と TBE バッファーを用い、25 V、278 mA、65 分かけてブロッティングした。ブロッティング終了後のメンブレンは 80 分間、風乾させた後、3 分間の UV 照射による UV 固定を行った。

11-5. 抗体反応・検出

メンブレンを 1×ブロッッキングバッファー(10×ブロッッキングバッファーをマレイン酸バッファーで 10 倍に希釈)に入れ、ブロッッキングを行った。その後、抗体溶液(Anti-Digoxigenin-AP)10,000 倍希釈液と反応させ、45 分後、洗浄バッファーで洗浄した。次に DIG 検出バッファーを 3 回に分けて 2 分間振盪させた後、メンブレンの水を切り、CSPD 液をメンブレンによくなじませた。その後はプロトコルに従いフィルムに露光させた。

結果

イネ根への **particle bombardment** 法による遺伝子導入実験系の確立

これまでの先行研究で、*RSOsPR10* 遺伝子上流 1.9 kbp, 2.9 kbp, 4 kbp を GUS レポーターにつないだコンストラクトを導入した形質転換体では、根特異性および JA, ET による発現誘導を制御する主要プロモーター領域が遺伝子上流 2.9 kbp 以内に存在することが示唆されている (参考図 8)。そこで私は今後より詳細なプロモーター解析を進めていくには候補領域をさらに狭めた解析や、候補シス配列に変異を加えて影響を検討していく必要があると考えた。

イネの形質転換体の作製には半年ほどの長い時間を必要とする。そこで私は、**particle bombardment** 法を用いた一過的発現系で詳細を検討することにした。一般的に **particle bombardment** 法は葉や培養細胞など、表面積が大きい試料に用いられる遺伝子導入手法である。当研究室の先行研究でもイネの培養細胞を用いて一過的発現解析が検討された。しかし、培養細胞は常にストレスを受けた状態にあることが考えられ JA による有意な誘導がみられないだけでなく、データのばらつきが多いなど一過的発現解析には不向きであった。そこで私はイネの根に直接遺伝子導入し、一過的発現解析が行えないか検討した。上述した通り、**particle bombardment** 法を葉や培養細胞に施すことは一般的だが、イネの根に遺伝子導入した報告は今までにない。そこで、**particle bombardment** 法がイネの根でも有用であるか検討するため、まずは *35S::GFP* コンストラクトを用いて導入効率が高い条件を可視化することで調べた。その結果、金粒子の直径 1.0 μm 、導入時の圧力 1,100 (Psi)、打ち込む距離 6 cm において最も GFP の蛍光を観察できる細胞が多いことが分かった(図 1(A), (B))。そこで、先行研究で根特異的な JA 応答性および SA 抑制が確認されている *RSOsPR10* の 4 kb プロモーター領域を LUC レポーターに連結したコンストラクト(図 2)を導入した。しかし、導入効率の指標である *renilla luciferase* (RLUC) の値が低かったため、遺伝子導入回数を 1 発と 2 発で比較した。その結果、2 発導入が JA 処理による誘導効率および遺伝子導入効率が高いことが分かった(図 1(C))。次に先行研究から根特異性が観察されている *2.9K*(図 2) を用いて野生型イネの根および葉に導入したところ、根では JA 処理による有意な誘導が見られたのに対し、葉では JA 処理による誘導は見られなかった(図 3)。

一過的発現系による発現制御領域の検討

これまでの先行研究から、*RSOsPR10* の転写レベルでの根特異的な発現誘導が乾燥、塩、傷害といったストレス刺激受容後、JA と ET を介して誘導され、その誘導が SA によりほぼ完全に抑制されることが示されている(Hashimoto et al., 2004; Takeuchi et al., 2011)。本研究では、JA 誘導性と SA によるその誘導抑制を制御するプロモーター領域を特定する

ため、遺伝子の転写開始点より 1 塩基上流から 1.9, 2.7, 2.9, 3.3 および 4 kbp プロモーター領域を LUC につないだレポーターコンストラクト(1.9K, 2.7K, 2.9K, 3.3K, 4K(図 2)) をイネの根に particle bombardment 法を用いて導入し、JA および JA+SA 同時処理による発現への影響を検討した。その結果、2.9K, 3.3K, 4K では JA 処理による有意な誘導が見られ、さらに SA 処理によってその誘導が抑制されることが示された。一方、2.7K では JA 処理による誘導は僅かしか見られず、1.9K では JA 応答性は見られなかった(図 4)。

***RSOsPR10* プロモーター領域におけるシス配列の探索**

一過的発現系による発現制御領域の解析から、*RSOsPR10* 遺伝子の JA 誘導に働くシス配列が遺伝子上流 2701 から 2924 bp の 223 bp の領域に存在することが示唆された。そこで、*RSOsPR10* 遺伝子上流 2701 から 2924 bp の領域を中心にストレス応答に関与する転写因子のシス配列の探索を行った。イネのストレス応答に関与する転写因子およびストレス刺激受容後に応答する植物ホルモンのシグナル伝達に関与する既知の情報伝達因子の結合配列として推定されているシス配列の中から、*RSOsPR10* 遺伝子の発現制御に関与が予想される転写因子およびシス配列を推定し、*RSOsPR10* プロモーター領域内に存在するのかが検討した。

RSOsPR10 遺伝子上流 4 kb 以内には、JA および ET 応答性の転写因子 ERF が結合する可能性のある GCC-box (GCCGCC) は 7 つ、乾燥応答関連因子 DREB の結合配列である DRE (A/GCCGAC) は 4 つ、エリシター応答性 bZIP 型転写因子 TGA の認識配列 TGACG-motif (TGACG) は 1 つ、病害応答に関与する WRKY の結合配列 W-box (T/CTGACC/T) は 9 つ存在している。一方で、JA 応答配列 JERE (AGACCGCC) や JA 応答性転写因子 MYC2 の結合配列 G-box (CACGTG) など、JA 誘導性に関与が想定されるようなシス配列は見つかっていない。このように、多くのシス配列の存在が明らかとなっているが、*RSOsPR10* 遺伝子上流 2701 から 2924 bp の領域内には ERF 結合配列の GCC-box が密集して 4 つと、WRKY の結合配列 W-box が 1 つ存在するのみであった (図 5)。

***RSOsPR10* の JA/ET による発現誘導に関わるシス配列の検討**

シス配列探索の結果から、*RSOsPR10* 遺伝子上流 2701 から 2924 bp の領域には JA および ET 応答性の転写因子 ERF が結合する可能性のある GCC-box が存在することが分かっている。そこで、この領域内にある GCC-box が *RSOsPR10* の JA 処理による発現誘導に関与するかどうか検討を行った。2.9K を鋳型とし、GCC-box に変異を 1 つ入れたコンストラクト(2.9K[G4 mut])および、4 つの GCC-box 全てに変異を入れたコンストラクト(2.9K[G2-5 mut]) (図 2)を作製し、野生型イネの根に導入後、JA 処理による発現誘導を検討した。その結果、2.9K[G4 mut] の JA 応答性は 2.9K と同程度であったのに対し、

*2.9K/G2-5 mut*の JA 応答性は *2.7K*と同程度まで減少した (図 6(A))。

***RSOsPR10* の JA/ET による発現誘導における OsERF1 の関与**

RSOsPR10 遺伝子の根特異的な転写レベルでの発現誘導は乾燥、塩、傷害といったストレス刺激受容後、JA と ET を介して誘導され、その発現誘導には ET および JA 応答性の転写因子 OsERF1 の関与が示唆されている(Takeuchi et al., 2011)。上述の実験結果より、*RSOsPR10*の発現誘導には GCC-box の関与が示唆されたことから、GCC-box に結合すると考えられる ERF が発現誘導に関わる可能性が考えられた。特に OsERF1 の関与を検討するため、まず初めに ERF1 T-DNA 挿入株を入手し JA 処理時の *RSOsPR10* mRNA の発現量の測定を qRT-PCR を用いて行った。形質転換体およびバックグラウンドである WT (Dongjin)イネでの *OsERF1* mRNA 発現量を測定し、形質転換体において標的遺伝子がノックダウン(KD)していることを確認した後、実験を進めた(図 7(A))。その結果、*ERF1* KD では野生型イネと比較して *RSOsPR10* の JA 処理による発現誘導が有意に減少していることが分かった (図 7(B))。このことにより、OsERF1 が *RSOsPR10* の JA 処理による発現誘導機構の一端を担っている可能性が示唆された。

さらに OsERF1 の JA 誘導性への関与を検討するため、35S プロモーターに OsERF1 をつないだコンストラクト(*35S::ERF1*)と *2.9K*を野生型イネの根に共導入してレポーターアッセイを行った。しかし、*35S::ERF1*を共導入しても *2.9K*の LUC 活性に影響を与えなかった (図 8)。

***RSOsPR10* の発現制御に関わる新規誘導因子の同定**

シロイヌナズナにおいて ERF ファミリーである ORA59 が JA/ET 経路に重要な役割を果たしていることが知られている(Lorenzo et al., 2003; Pre et al., 2008)。そこでイネの ERF ファミリーにおいてタンパク質モチーフ、アミノ酸配列および塩基配列から ORA59 に類似する ERF を JA/ET 誘導候補として探索した(図 9)。その中から OsERF83、OsERF87、OsERF88 をクローニングし、35S プロモーターに繋いだコンストラクトを作成してエフェクターアッセイを行った。その結果、OsERF87 を *2.9K*と共導入すると高い誘導活性のあることが見出された(図 8)。OsERF87 の機能に関してはこれまでに全く報告がないことから、細胞内での局在を解析するため、OsERF87-GFP 融合タンパクを発現させるコンストラクトをタマネギの表皮細胞に particle bombardment 法により導入した。すると ERF87 は核に局在することが明らかとなった(図 10)。以上より、これまで候補として考えてきた OsERF1 だけでなく、*RSOsPR10* の誘導に働く JA/ET 経路の新規因子として OsERF87 を同定した。

***RSOsPR10* の SA による発現誘導抑制に関わる転写因子の検討**

OsWRKY76 はサリチル酸の類縁体である BTH により強く誘導される WRKY 転写因子として同定され、最近の研究から OsWRKY76 が複数の PR タンパク質やファイトアレキシン合成に関与する遺伝子など、防御応答に関与する遺伝子の発現において W-box 配列への結合を介して転写抑制因子として機能することが報告されている(Yokotani et al., 2013)。当研究室の先行研究においても、WRKY76 過剰発現体 (WRKY76OX) において *RSOsPR10* の JA による発現誘導の顕著な抑制と、WRKY76 ノックアウト体 (WRKY76KO) における JA+SA 同時処理による *RSOsPR10* 発現の誘導抑制が野生型に比べ減衰する傾向があることが確認されている(高尾翠、修士論文、2012., 吉田悠里、修士論文、2013.)。これらのことから OsWRKY76 は SA で誘導され、*RSOsPR10* の発現誘導の SA による抑制に関与する可能性が示唆されている。

本研究では OsWRKY76 の SA による誘導抑制への関与を検討するため、WRKY76 OX および WRKY76 KO イネの根に *2.9K* を導入した。その結果、野生型イネと比較して WRKY76 OX において JA 処理による LUC 活性が有意に抑制された。一方で WRKY76 KO に導入した場合は、野生型と同程度の JA による誘導が見られた(図 11)。

さらに OsWRKY76 の関与を検討するため、35S プロモーターに OsWRKY76 をつないだコンストラクト(*35S::WRKY76*)と *2.9K* を野生型イネの根に共導入してレポーターアッセイを行った。その結果、ネガティブコントロール (*35S::GAL4DB*) と比較して有意に JA による誘導が抑制された(図 12)。また、上述のように *35S::ERF87* の共導入は *2.9K* の発現を大きく増加させるが、これに *35S::WRKY76* をさらに共導入すると、その増加も強く抑制された(図 12)。

***RSOsPR10* の SA による発現誘導抑制に関わるシス配列の検討**

データベース検索から OsWRKY76 の結合配列である W-box ((T/C)TGAC(C/T))が *RSOsPR10* プロモーター領域に複数存在することが明らかとなっている(図 5、参考表 2)。*RSOsPR10* の JA 誘導を制御するシス配列が存在する本遺伝子上流 2701 から 2924 bp の領域には 1 つの W-box が存在している。そこで、この W-box が SA による誘導抑制に関わる可能性を検討するため、*2.9K* を鋳型とし、W-box に変異を入れたコンストラクト (*2.9K/W2 mut*) を作製した。このコンストラクトを野生型イネの根に導入後、JA 処理および JA+SA 同時処理による発現誘導/発現誘導抑制を検討した。その結果 *2.9K* と同様に JA 処理による誘導と JA+SA 同時処理による誘導抑制が見られた(図 6(B))。

OsWRKY76 の W-box 配列への結合解析

変異体を用いた解析や一過的発現系による解析から *RSOsPR10* の発現誘導抑制に関わる因子として OsWRKY76 の関与が強く示唆されている。そこで本研究では OsWRKY76 が

RSOsPR10 の発現制御にトランス因子として機能するかどうか検討するため、ゲルシフトアッセイを行った。OsWRKY76 は MBP と融合し、大腸菌で発現させた MBP-WRKY76 融合タンパクを使用した。オリゴヌクレオチドは本遺伝子上流 2701 から 2924 bp の領域にある W-box 配列を digoxigenin (DIG) でラベルしたものを使用した (図 13 (A))。すると、MBP-WRKY76 融合タンパクは W-box に特異的に結合するが、ネガティブコントロールである MBP は結合しなかった。さらに、MBP-WRKY76 融合タンパクは W-box に変異を 1 塩基、または 4 塩基入れたオリゴヌクレオチドには両者ともに結合しなかった (図 13 (B))。

考察

RSOsPR10 は塩や乾燥処理により発現が根特異的に誘導され、過剰発現させた形質転換イネでは野生型と比較して高い乾燥耐性を示したことから、RSOsPR10 がストレス耐性獲得に何らかの重要な役割を担っていることが考えられている。本研究では、*RSOsPR10* 遺伝子の発現制御機構の解明を目的とし、主にレポーターアッセイによる JA 誘導性や SA 抑制性を制御する領域および転写因子の検討を行った。

イネ根における particle bombardment 法による一過的発現実験系の確立

機能未知のタンパク質やプロモーター活性を調べる方法としては一般的に、GFP や LUC などの蛍光タンパク質を用いて局在観察や定量が行われている。これらタグ付けされた蛍光タンパク質を植物体で発現させるためには、発現させるコンストラクトを植物体に遺伝子導入する必要がある。遺伝子導入方法は複数知られており、主要となるのがアグロバクテリウムを用いた遺伝子導入である。植物では安定して形質転換体が生じやすいと言われており、頻繁に使用されるが、形質転換体の作出に長い期間を要するといった欠点がある。particle bombardment 法は金粒子に DNA を固着させて高い圧力下で金粒子を射出することで、物理的に遺伝子導入をする手法である。この方法を用いると、アグロバクテリウムが感染できない植物に対しても遺伝子導入が有用なだけでなく、時間や労力の節約もすることが出来るなどの利点がある(Van Loock et al., 2010)。

本研究においてもこの利点に着目し、particle bombardment 法を用いた一過的発現系による *RSOsPR10* プロモーター解析を行うこととした。しかし、particle bombardment 法を用いたプロモーター解析は一般的に葉(Hwang et al., 2008)や培養細胞(Chujo et al., 2009; Miyamoto et al., 2012)など表面積の大きい試料に用いられ、植物の根に遺伝子導入した報告はなかった。これまでに報告されている根特異的なタンパク質の局在やプロモーター解析は、抗体を用いた免疫組織化学染色による観察(Takeuchi et al., 2011)やプロモーターを GUS などに繋いだ形質転換体を生じ、時間や労力をかけて解析が行われてきた(Li et al., 2013)。しかし私は、イネの根における particle bombardment 法を用いて遺伝子導入が確認されたことからイネの根においても一過的発現系が有用であることを初めて示し、実験系を確立した(図 1)。根特異的な遺伝子の解析があまり進んでいない現状と、その詳細なプロモーター解析が進んでいないことが相まって、今までに根で particle bombardment 法が用いられてこなかったと考えられるが、今後は根での一過的発現解析が本手法を参考として進むことが期待される。労力的にも時間的にも簡略化されたため、根特異的なタンパク質の細胞内局在解析やプロモーター解析などの研究が世界で進んでいくことに一石を投じることができたと考えている。

***RSOsPR10* 遺伝子の発現誘導制御機構**

RSOsPR10 の根特異的な発現は、塩、乾燥、傷害などのストレス刺激受容後、JA や ET を介して JA/ET 経路によって誘導されることが転写レベルおよび翻訳レベルで明らかにされている(参考図 5)。この発現誘導には ET および JA 応答性の転写因子 OsERF1 の関与が示唆されている(Takeuchi et al., 2011)。しかしながら、*RSOsPR10* の転写レベルでの根特異的な JA/ET による発現誘導の詳細は明らかとなっていない。

本研究により、遺伝子上流 2701 bp から 2924 bp 領域の僅か 223 bp 以内にある複数の GCC-box が発現誘導に関与することが示された(図 6(A))。GCC-box は ERF ファミリーが結合するシス配列であることから、発現誘導には ERF タンパク質が関与することが考えられる。さらに、*ERF1* KD イネを用いた *RSOsPR10* mRNA 発現量の解析において、*ERF1* KD イネでは野生型イネと比較して *RSOsPR10* の JA 処理による発現誘導が有意に減少していたことから、*RSOsPR10* の発現誘導には OsERF1 の関与が示された (図 7(B))。しかしながら図 7(B)の結果で、*ERF1* KD イネにおいて *ERF1* の JA 処理による誘導率が野生型と比較して約 17%に低下しているのに対し、*RSOsPR10* の JA 処理による誘導率は野生型と比較して約半分程度にしか減少していなかった。このことは、*RSOsPR10* の発現誘導に OsERF1 だけでなく、GCC-box に結合する別な誘導因子(他の ERF を含む)も働いていることを示唆している。近年シロイヌナズナを用いた研究から、ERF ファミリーの 1 つである ORA59 が JA/ET 経路を介して JA 応答マーカーの *PR* 遺伝子である *PDF1.2 (PLANT DEFENSIN1.2)* の主要な発現誘導因子として働くことが分かってきた(Pre et al., 2008; Zarei et al., 2011)。イネにおいても ORA59 が JA および ET 応答に関わっていることを推察したが、イネでの ORA59 は未だ報告されていない。そこで、SALAD Database を用いたタンパクモチーフ解析(Mihara et al., 2010)および ClustalW を用いたアミノ酸配列の相同性検索により、イネでの ORA59 オルソログを探索した。タンパクモチーフ解析の結果シロイヌナズナの ORA59 はイネの OsERF83, OsERF86, OsERF87, OsERF88, OsERF136 と似ていることが分かった(図 9)。このうち、ClustalW2 を用いてアミノ酸配列および塩基配列の相同性を検索した結果、OsERF83(アミノ酸 : 36%、塩基 : 52%)、OsERF86(アミノ酸 : 34%、塩基 : 52%)、OsERF87(アミノ酸 : 35%、塩基 : 50%)が ORA59 と相同性が高いことが分かった。次に、Rice X Pro(Rice Expression Profile Database)を用いてマイクロアレイ解析による、根および葉での JA 処理による発現誘導を調べた。その結果、OsERF86 は JA 処理による誘導がされないことが分かった。一方で、OsERF83 と OsERF87 は JA 処理による根特異的な誘導がみられ、葉では誘導されないことが分かった。さらに ABA 処理でも誘導はされないことから、*RSOsPR10* の発現パターンと類似していた。これらのことから、イネにおいても OsERF83, OsERF87 のどちらか(あるいは両者)が JA/ET 経路を介した *RSOsPR10* の発現誘導に関与することが推定される。そこでこれらの ERF が *RSOsPR10* の発現誘導に関与するか、エフェクターアッセイによる検討を行った。すると、

OsERF87 が *RSOsPR10* の高い誘導活性を持つことが見出された(図 8)。一方で ERF83 に誘導活性はみられなかった。OsERF87 はこれまでに報告がない ERF タンパクであることから、その機能を推定するため ERF87-GFP 融合タンパクを発現させるコンストラクトを用いて細胞内の局在を解析したところ、核に局在した。このことから、OsERF87 は核に局在し転写因子として働いていることが示唆された(図 10)。

中野ら(Nakano et al., 2006)の分類によると ORA59 はシロイヌナズナ ERF ファミリーのグループIXcに属する。このグループは8つの ERF が分類されており、C末端側に CMIX-1 および CMIX-4 と呼ばれるドメインを持つのが特徴である。同様にイネ ERF ファミリーのグループIXc には 11 の ERF が分類されており、この中に OsERF83、OsERF86、OsERF87 および ERF88 も属している。このグループの ERF は病原感染応答の遺伝子発現に関与の報告や、サリチル酸、ジャスモン酸、エチレンなどのストレス応答に関わる植物ホルモンによって誘導されることが知られている(Onate-Sanchez and Singh., 2002)。そこで、各 ERF のアミノ酸配列の相同性を比較した(図 14)。まず、ERF88 は CMIX-4 ドメインを持っていないことから他の ERF と比べて働きは大きく異なることが推察されるため、主に OsERF83、OsERF86、OsERF87 に注目して考察する。CMIX-4 において OsERF83 のみ 6-Arg、8-Met、35-Ala が他の ERF とは異なる配列をしていた。さらに CMIX-1 において OsERF83 は 14-Met、21-Pro が異なる配列をしていた。CMIX-1 と CMIX-4 は上述したように ERF グループIXc に共通するドメインであるが、その機能は明らかとなっていない。おそらく OsERF83 はこれらアミノ酸置換により、*RSOsPR10* の誘導活性を持たないことが推測される。一方で、OsERF86 と ERF87 は CMIX-1 および CMIX-4 とも配列は酷似している。このことから、OsERF86 も *RSOsPR10* の誘導活性を持つ可能性が考えられるが、RAP-DB (The Rice Annotation Project Database) によるマイクロアレイ解析の結果から OsERF86 はジャスモン酸処理では誘導されないことが示されている。そのため、JA 処理による *RSOsPR10* の発現誘導には ERF87 が主要な誘導因子として働くと考えられる。一過的発現系において、OsERF86 が *RSOsPR10* の誘導活性を示すか検討するため、クローニングを試みているがうまく進んでいない。OsERF86 のクローニングを成功させ、エフェクターアッセイを行うことで誘導活性を持つか調べていきたい。

本研究において OsERF87 の関与は in vitro におけるエフェクターアッセイの結果しか得られていない。今後の課題として、in vivo においても OsERF87 が *RSOsPR10* の発現誘導に関与するか検討する必要がある。OsERF87 過剰発現体およびノックアウト体を用いて *RSOsPR10* mRNA 発現量を qRT-PCR により解析することでその課題を解決していきたい。

***RSOsPR10* 遺伝子の誘導抑制機構**

RSOsPR10 の根特異的な発現は、塩、乾燥、傷害などのストレス刺激受容後、JA や ET を介して JA/ET 経路によって誘導され、その誘導が SA により抑制されることが転写レベ

ルおよび翻訳レベルで明らかにされている(参考図 5)。この発現誘導抑制には病害応答関連の転写因子 OsWRKY76 の関与が示唆されている(参考図 7)。しかしながら、*RSOsPR10* の転写レベルでの根特異的な JA/ET による発現誘導の SA による発現誘導抑制機構の詳細は明らかとなっていない。

本研究により、WRKY76 過剰発現イネの根に *2.9K* を導入すると発現誘導が抑制されるだけでなく(図 11)、WT イネに *2.9K* と *35S::WRKY76* を共導入したレポーターアッセイにおいても抑制が確認されたことから(図 12)、WRKY76 が *RSOsPR10* の発現の SA による誘導抑制に関与することが示された。OsWRKY76 は WRKY 転写因子ファミリーに属するタンパク質である。WRKY 転写因子とはトリプトファン(W)、アルギニン(R)、リジン(K)、チロシン(Y)の一連のアミノ酸配列と Zinc-finger ドメインを持ち、植物の中で大きなクラスを構成する DNA 結合タンパク質である(Eulgem et al., 2000; Elugem., 2006; Pandey and Somssich., 2009)。WRKY 転写因子のその保存された WRKY ドメインは結合領域である W-box ((C/T)TGAC(T/C))に優先的に結合することが知られており(Ciolkowski et al., 2008)、WRKY 転写因子の DNA 転写制御を検討する上で、W-box の存在は必須と考えられる。

RSOsPR10 遺伝子上流 2.9 kb 以内には W-box が 7 つ存在することがデータベースにより明らかになっている(参考表 2)。その中でも、6 つの W-box は遺伝子上流 1.9 kb 以内に存在し、残りの W-box は *RSOsPR10* の発現誘導に関与する GCC-box が密集して存在している 2.7 から 2.9 kb 以内にある。そこで、この W-box が SA による誘導抑制に関与すると仮定した。ゲルシフトアッセイによる結果から、この領域にある W-box に、特異的に OsWRKY76 が結合することが示された(図 13)。しかし、W-box に変異を入れたコンストラクト(*2.9K[W2 mut]*)を野生型イネに導入しても JA+SA 処理による *RSOsPR10* の発現誘導抑制に影響は及ぼさなかった(図 6(B))。また、*2.7K* 導入時にも JA+SA 処理により誘導が抑制されていることから(図 6(A))、*RSOsPR10* の発現制御には遺伝子上流 1.9 kb 以内に存在する 6 つの W-box も SA による誘導抑制に関与することが示唆された。このように、複数の W-box が重複して発現制御に働いていることは報告されている。例えば、イネの防御応答に関与する *WRKY53* 遺伝子のプロモーター領域にある 3 つの W-box のうち、1 つ変異を入れただけでは *WRKY53* の発現が誘導されるのに対し、それぞれを 2 つ、もしくは全ての W-box に変異を入れると発現が誘導されなくなる(Chujo et al., 2009)。また、WRKY53 と高い相同性を示すシロイヌナズナ AtWRKY33 も同様に複数の W-box が重複して発現制御に働いていることが報告されている(Lippok et al., 2007)。さらに、2 つの WRKY が 2 か所の W-box に結合しダイマーを形成することで働くことも報告されている(Chi et al., 2013)。これらの知見を踏まえて、*RSOsPR10* の SA による発現誘導抑制には OsWRKY76 が関与しており、プロモーター上にある複数の W-box に結合することで制御に関与することが考えられる。今後は、各 W-box に変異を入れたコンストラクトを作製し、SA による誘

導抑制が抑制への関与を確かめる必要がある。

WRKY76 は *RSOsPR10* の抑制因子として役割を担っていると考えられるが、*WRKY76* KO における JA+SA 処理による抑制が完全には解除されていないこと（参考図 7）や、*WRKY76* KO に *2.9K* 導入時の JA+SA 処理においても抑制が解除されない(data not shown)ことを考慮すると、抑制因子としては *OsWRKY76* 以外の因子も働いていることが示唆される。

WRKY76 は WRKY ドメインを 1 つと C₂H₂ zinc finger motif を持つ特徴と系統解析から WRKY II a グループに分類されている。今日までにこのグループの WRKY タンパクは解析が進められている。シロイヌナズナの AtWRKY18、AtWRKY40、AtWRKY60 は病原菌感染への防御応答に対して負の制御をすることが報告されている(Xu et al., 2006)。さらに、オオムギの HvWRKY1、HvWRKY2 は菌感染に対して防御応答に抑制的に働くことが知られている(Shen et al., 2007)。イネの WRKY II a グループには *OsWRKY28*、*OsWRKY62*、*OsWRKY71*、*OsWRKY76* が分類されており、イネいもち病菌感染により発現が誘導され、防御応答に対して負に働くことが報告されている(Ryu et al., 2006; Shimono et al., 2007; Chujo et al., 2008; Delteil et al., 2012)。これら WRKY によって負に制御される遺伝子群の中には PR10b や PR1-like、PR5 など PR 遺伝子も含まれている。さらに中条らの WRKY II a グループ相同検索により、転写抑制に働くドメインが推定されている(Chujo., 2013)。これによると、*OsWRKY62* は転写抑制ドメインを持たない(図 15)。以上より、WRKY28、WRKY71 のいずれか（もしくは両者）が *RSOsPR10* の発現誘導抑制に関与することが考えられる。これらの関与を検討するため、各過剰発現体およびノックダウン体を用いた *RSOsPR10* mRNA 発現量解析を行っていくことが今後必要である。また、最近では WRKY タンパク質がホモ、ヘテロダイマーを形成したり、さらに VQ タンパク質など様々な因子と相互作用して働くことが分かってきており(Chi et al., 2013)、このような因子の関与についても検討を加える必要がある。

***RSOsPR10* 発現制御機構のモデル**

本研究により、*RSOsPR10* の発現誘導には JA/ET 経路を介した *OsERF87* および *OsERF1* が、誘導抑制には SA 経路を介した *OsWRKY76* の働くことが示された。

ERF は GCC-box に結合することが知られていることから、*OsERF87* や *OsERF1* も GCC-box に結合し転写制御をしていることが考えられる。また、*OsWRKY76* は *RSOsPR10* プロモーター領域の W-box に結合が確認できたことから(図 13)、W-box に結合することで誘導抑制していることが考えられる。以上より、本研究から得られた知見を元に *RSOsPR10* 発現シグナル推定経路図を作成した(図 16)。

イネにおける JA/ET による誘導と SA による抑制の生物学的な意味

本研究から RSOsPR10 の発現制御機構の一端が明らかとなってきたことから、詳細な解明が進んでいない JA/ET と SA クロストーク制御の生物学的な意味について考察したい。

植物のストレス応答に複数の植物ホルモンが関わっており、互いにクロストークしていることは序論で示したが(参考図 1)、その複雑なメカニズムの全容は未だ解明されていない。

本研究対象の *RSOsPR10* 遺伝子も JA/ET と SA クロストーク制御される遺伝子である。*RSOsPR10* は JA や ET といった植物ホルモン処理だけでなく、乾燥、塩、傷害といった環境ストレスでも誘導されることが明らかとなっている(参考図 6)。さらにこの誘導は病傷害ストレス応答において重要な植物ホルモンである SA 同時処理により抑制される(参考図 5)。このことから、傷害や乾燥ストレスなど JA 依存的な比較的軽微なストレスへの防御機構の際に *RSOsPR10* は誘導され、根の成長促進も含めた生理機能により、ストレス耐性に寄与していると考えられる。一方で、病原菌感染など重篤な病傷害を引き起こす生物学的ストレスにさらされた時には SA 依存的な防御機構が優先的に働き、*RSOsPR10* の発現誘導を抑制してでも重篤なストレスへの抵抗性を高めようとしていると考えられる。これら SA と JA/ET の拮抗的な仕組みは、植物がストレス応答に対して用いるエネルギーのコストバランス調節をすることで複雑な自己防御機構を効率よく機能させていると考えられる。本研究のように世界的に重要な農作物であるイネにおいて SA と JA/ET 経路の拮抗的な仕組みを分子レベルで研究し、JA 経路の誘導因子 ERF87 および SA 経路の抑制因子 WRKY76 といった関連因子まで同定した報告はなく、イネにおける SA と JA/ET のクロストークを介した環境ストレスと病害抵抗性獲得の機構解明の一端を明らかにした重要な成果であると考えている。

引用文献

Agarwal P and Agarwal PK. (2014) Pathogenesis related-10 proteins are small, structurally similar but with diverse role in stress signaling. *Mol Biol Rep* 41, 599-611.

Berrocal-Lobo M and Molina A. (2004) Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant-Microbe Interact* 17, 763-770.

Breiteneder H, Pattenburger K, Bito A, Valenta R, Kraft D, Rumpold H, Scheiner O, Breitenbac M. (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen *Betv I*, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *The EMBO Journal* 8, 1935-1938.

Chi Y, Yang Y, Zhou Y, Zhou J, Fan B, Yu JQ and Chen Z. (2013) Protein-protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors. *Molecular Plant* 6, 287-300.

Chiu WI, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J. (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* 6, 325-330.

Choi J, Huh SU, Kojima M, Sakakibara H, Paek KH, Hwang I. (2010) The Cytokinin-Activated Transcription Factor ARR2 Promotes Plant Immunity via TGA3/NPR1-Dependent Salicylic Acid Signaling in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 19, 284-295.

Chujo T, Kato T, Yamada K, Takai R, Akimoto-Tomiyama C, Minami E, Nagamura Y, Shibuya N, Yasuda M, Nakashita H, Umemura K, Okada A, Okada K, Nojiri H, Yamane H. (2008) Characterization of an elicitor-induced rice WRKY gene, OsWRKY71. *Biosci Biotech Biochem* 72, 240-245.

Chujo T, Miyamoto K, Shimogawa T, Shimizu T, Otake Y, Yokotani N, Nishizawa Y, Shibuya N, Nojiri H, Yamane H, Minami E, Okada K. (2013) OsWRKY28, a PAMP-responsive transrepressor, negatively regulates innate immune responses in rice against rice blast fungus. *Plant Mol Biol* 82, 23-37.

Chujo T, Sugioka N, Masuda Y, Shibuya N, Takemura T, Okada K, Nojiri H, Yamane H. (2009) Promoter analysis of the elicitor-induced WRKY gene *OsWRKY53*, which is involved in defense responses in rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 73, 1901-1904.

Ciolkowski I, Wanke D, Birkenbihl RP, Somssich IE. (2008) Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant Mol Biol* 68, 81-92.

Delteil A, Blein M, Faivre-Rampant O, Guellim A, Estevan J, Hirsch J, Bevitori R, Michel C, Morel JB. (2012) Building a mutant resource for the study of disease resistance in rice reveals the pivotal role of several genes involved in defence. *Mol Plant Pathol* 13, 72-82.

Eulgem T. (2006) Dissecting the WRKY web of plant defense regulators. *PLoS Pathogens* 2, e126.

Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5, 199-206.

Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Yasuomi, Zheng N, Dong X. (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* 486, 228-232.

Hashimoto M, Kisseleva L, Sawa S, Furukawa T, Komatsu S, Koshiba T. (2004) A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stress, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant Cell Physiology* 45, 550-559.

Haque ME, Abe F, Mori M, Oyanagi A, Komatsu S, Kawaguchi K. (2014) Characterization of a wheat pathogenesis-related protein, TaBWPR-1.2, in seminal roots in response to waterlogging stress. *Journal of Plant Physiology* 171, 602-609.

Huang JC, Chang FC, Wang CS. (1997) Characterization of a lily tapetal transcript that shares sequence similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (IPR) proteins. *Plant Mol Biol* 34, 681-686.

Hsu SQ, Liu MC, Zen KC, Wang CS. (2014) Identification of the tapetum/microspore-specific promoter of the pathogenesis-related 10 gene and its regulation in the anther of *Lilium longiflorum*. *Plant Science* 215-216, 124-133.

Hwang SH, Lee IA, Yie SW, Hwang DJ. (2008) Identification of an *OsPR10a* promoter region responsive to salicylic acid. *Planta* 227, 1141-1150.

Joo J, Choi HJ, LEE YH, Kim YK, Song SI. (2013) A transcriptional repressor of ERF family confers drought tolerance to rice regulates genes preferentially located on chromosome 11. *Planta* 238, 155-170.

Jwa NS, Agarwal GK, Rakwal R, Park CH, Agarwal VP. (2001) Molecular Cloning and Characterization of a Novel Jasmonate Inducible Pathogenesis-Related Class 10 Protein Gene, *JIOsPR10*, from Rice (*Oryza sativa* L.) Seedling Leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 286, 973-983.

Kazan K and Manners JM. (2008) Jasmonate Signaling: Toward an Integrated View. *Plant Physiology* 146, 1459-1468.

Kim ST, Yu S, Kang YH, Kim SG, Kim JY, Kim SH, Kang KY. (2008) The rice pathogen-related protein 10 (JIOsPR10) is induced by abiotic and biotic stresses and exhibits ribonuclease activity. *Plant Cell Rep* 27, 593-603.

Kim YJ, Jang MG, Lee HJ, Jang GH, Sukweenadhi J, Kwon WS, Yang DC. (2014) Functional characterization of pathogenesis-related protein family 10 gene, *PgPR10-4*, from *panax ginseng* in response to environmental stresses. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 118, 531-543.

Kinkema M, Fan W, Dong X. (2000) Nuclear Localization of NPR1 Is Required for Activation of PR gene Expression. *Plant Cell* 12, 2339-2350.

Koornneef A and Pieterse CML. (2008) Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiology* 146, 839-844.

Lee EJ, Facchini P. (2010) Norcoclaurine Synthase Is a Member of the Pathogenesis-Related 10/Bet v1 Protein Family. *Plant Cell* 22, 3489-3503

Lee MW, Qi M, Yang Y. (2001) A novel Jasmonic acid-inducible rice *myb* gene associates with fungal infection and host cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact* 14, 527-535.

Leon-Reyes A, Du Y, Koornneef A, Proietti S, Korbes A, Memelink J, Pieterse CMJ, Ritsema T. (2010) Ethylene signaling renders the jasmonate response of *Arabidopsis* insensitive to future suppression by salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact* 23, 187-197.

Leon-Reyea , Spoel SH, Lange ESD, Abe H, Kobayashi M, Tsuda S, Millenaar FF, Welschen RAM, Ritsema T, Pieterse CMJ. Ethylene modulates the role of NONEEXPRESSOR OF OATHOGENESIS-RERATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiology* 149, 1797-1809.

Level S, Schellenbaum P, Walter B, Maillot P. (2010) Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family. *BMC Plant Biology* 10, 184.

Li R, Afsheen S, Xin Z, Han X, Lou Y. (2013) OsNPR1 negatively regulates herbivore-induced JA and ethylene signaling and plant resistance to a chewing herbivore in rice. *Physiologia Plantarum* 147, 340-351.

Li Y, Liu S, Yu Z, Liu Y, Wu P. (2013) Isolation and characterization of two novel root-specific promoters in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* 207, 37-44.

Lippok B, Birkenbihl RP, Rivory G, Brummer J, Schmelzer E, Logemann E, Somssich I. (2007) Expression of *AtWRKY33* encoding a pathogen- or PAMP-responsive WRKY transcription factor is regulated by a composite DNA motif containing W box elements. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 420-429.

Lo S-CC, Hipskind JD, Nicholson RL. (1999) cDNA cloning of a Sorghum Pathogenesis-Related Protein (PR-10) and Differential Expression of Defense-Related Genes Following Inoculation with *Cochliobolus heterostrophus* or *Colletotrichum sublineolum*. *Mol. Plant-Microbe Interact* 12, 479-489.

Loon LCv, Geraats BPJ and Linthorst HJM. (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in plant Science* 11-4, 1360-1385.

Lorenzo O, Poqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R. (2003) ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15, 165-178.

Lorenzo O, Chico JM, Sanchez-Serrano JJ, Solano R. (2004) *JASMONATE-INSENSITIVE1* Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 1938-1950.

Mahajan S, Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stress: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139-158

Mao P, Duan M, Wei C and Li Y. (2007) WRKY62 Transcription Factor Acts Downstream of Cytosolic NPR1 and Negatively Regulates Jasmonate-Responsive Gene expression. *Plant Cell Physiology* 48, 833-842

Matton DP, Brisson N. (1989) Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. *Mol Plant Microbe Interact* 6, 325-331.

McGee JD, Hamer JE, Hodges TK. (2001) Characterization of a *PR-10* pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant-Microbe Interact* 14, 877-886.

McGrath KC, Dombrecht B, Manners JM, Schenk PM, Edgar CI, Maclean DJ, Scheible WR, Udvardi MK, Kazan K. (2005) Repressor- and Activator-Type Ethylene Response Factors Functioning in Jasmonate Signaling and Disease Resistance Identified via Genome-Wide Screen of Arabidopsis Transcription Factor Gene Expression. *Plant Physiology* 139, 949-959.

Memelink J. (2009) Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* 70, 1560-1570.

Midoh N, Iwata M. (1996) Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant Cell Physiol* 37, 9-18.

Mihara M, Itoh T, Izawa T. (2010) SALAD database: a motif-based database of protein annotations for plant comparative genomics. *Nucleic Acids Research* 38,.

Mitsuhara I, Iwai T, Seo S, Yanagawa Y, Kawahigashi H, Hirose S, Ohkawa Y, Ohashi Y. (2008) Characteristic expression of twelve rice *PR1* family genes in response to pathogen infection, wounding, and defence-related signal compounds (121/180). *Mol Genet Genomics* 279, 415-427.

Miyamoto K, Shimizu T, Lin F, Sainsbury F, Thuenemann E, Lomonossoff G, Nojiri H, Yamane H, Okada K. (2012) Identification of an E-box motif responsible for the expression of jasmonic acid-induced chitinase gene *OsChia4a* in rice. *Journal of Plant Physiology* 169, 621-627.

Moons A, Prinsen E, Bauw G, Van Montagu M. (1997) Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell* 9, 2243-2259.

Nakano T, Suzuki K, Fujimura T and Shinshi H. (2006) Genome-Wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and Rice. *Plant Physiology* 140, 411-432.

Onate-Sanchez L, Singh KB. (2002) Identification of Arabidopsis ethylene responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiology* 128, 1313-1322.

Pandey SP and Somssich IE. (2009) The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology* 150, 1648-1655.

Pre M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CM, Memelink J. (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology* 147, 1347-1357.

Reymond P and Farmer EE. (1998) Jasmonate and Salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 404-411

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY and Hunt MD. (1996) *Plant Cell* 8, 1809-1819.

Ryu HS, Han M, Lee SK, Cho JI, Ryoo N, Heu S, Lee YH, Bhoo SH, Wang GL, Hahn TR, Jeon JS. (2006) A comprehensive expression analysis of the WRKY gene superfamily in rice plants during defense response. *Plant Cell Rep* 25, 836-847.

Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC. (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 941-950.

Shen QH, Saijo Y, Mauch S, Biskup C, Bieri S, Keller B, Seki H, Ulker B, Somssich IE, Schulze-Lefert P. (2007) Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* 315, 1098-1103.

Shimono M, Sugano S, Nakayama A, Jiang CJ, Ono K, Toki S, Takatsuji H. (2007) Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *Plant Cell* 19, 2064-2076.

Silverman P, Seskar M, Kanter D, Schweizer P, Metraux JP, Raskin I. (1995) Salicylic Acid in Rice. *Plant Physiol* 108, 633-639.

Sinha M, Singh RP, Kushwaha GS, Iqbal N, Singh A, Kaushik S, Kaur P, Sharma S, Singh TP. (2014) Current Overview of Allergens of Plant Pathogenesis Related Protein Families. *The Scientific World Journal*, 19.

Somssich IE, Schmelzer E, Bollmann J, Hahlbrock K. (1986) Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 2427-2430.

Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Pelt JAV, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux JP, Brown R, Kazan K, Loon LCV, Dong X, Pieterse CMJ. (2003) NPR1

modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15, 760-770.

Spoel SH, Johnson JA, Dong X. (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 18842-18847.

Spoel SH, Mou Z, Tada Y, Spivey NW, Genschik P, Dong X. (2009) Proteasome-Mediated Turnover of the Transcription Co-Activator NPR1 Plays Dual Roles in Regulating Plant Immunity. *Cell* 137, 860-872.

Takeuchi K, Atsuko G, Makiko T, Madoka K, Atsushi H, Noriko I, Kentaro S, Takeshi N, Michael R, Peter N, Makoto H, Teruya K, Akira E, Takashi O, Yusuke J, Yuji K, Teruhiko T, Tomokazu K. (2011) RSOsPR10 expression in response to environmental stresses is regulated antagonistically by jasmonate/ethylene and salicylic acid signaling pathway in rice roots. *Plant Cell Physiology* 52, 1686-1696.

Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK. (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* 17, 1360-1385.

Turner JG, Ellis C, and Devoto A. (2002) The Jasmonate Signal Pathway. *Plant Cell*. S153-S164

Van Loock B, Markakis MN, Verbelen (2010) High-throughput transient transformation of Arabidopsis roots enables systematic colocalization analysis of GFP-tagged proteins. *Plant Signaling & Behavior* 5, 261-263.

van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 44, 135-162.

Verhage A, Wees SCMv, Pieterse CMJ. (2010) Plant Immunity: It's the Hormones Talking, But What Do They Say?. *Plant Physiology* 154, 536-540.

Vleeschauwer DD, Gheysen G, Hofte M. (2013) Hormone defense networking in rice: tales from a different world. *Trends in plant Science* 18, 1360-1385.

Wan L, Zhang J, Zhang H, Zhang Z, Quan R, Zhou S, Huang R. (2011) Transcriptional activation of OsDERF1 in *OsERF3* and *OsAP2-39* negatively modulates ethylene synthesis and drought tolerance in rice. *PLoS ONE* 6.

Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, Luca VD, Despres C. (2012) The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports* 1, 639-647.

Xie YR, Chen ZY, Brown RL, Bhatnagar D. (2010) Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. *J Plant Physiology* 167, 121-130.

Xu XP, Chen CH, Fan BF, Chen ZX. (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, WRKY60 transcription factors. *Plant Cell* 18, 13010-1326.

Yi J and An G. (2013) Utilization of T-DNA tagging lines in rice. *J. Plant Biol* 56, 85-90.

Yokotani N, Sato Y, Tanabe S, Chujo T, Shimizu T, Okada K, Yamane H, Shimono M, Sugano S, Takatsuji H, Kaku H, Minami E, Nishizawa Y. (2013) OsWRKY76 is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance. *Journal Experimental of Botany* 64, 5085-5097.

Yuan Y, Zhong S, Li Q, Zhu Z, Lou Y, Wang L, Wang J, Wang M, Li Q, Yang D, He Z. (2007) Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnol J* 5, 313-324.

Zharei A, Korbes AP, Younessi P, Montiel G, Champion A, Memelink J. (2011) Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the *PDF1.2* promoter in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 75, 321-331.

研究倫理

遺伝子組み換え実験は首都大学東京の研究倫理委員会の承認を得て行った。
承認番号は 26-36 である。

利益相反
該当しない。

謝辞

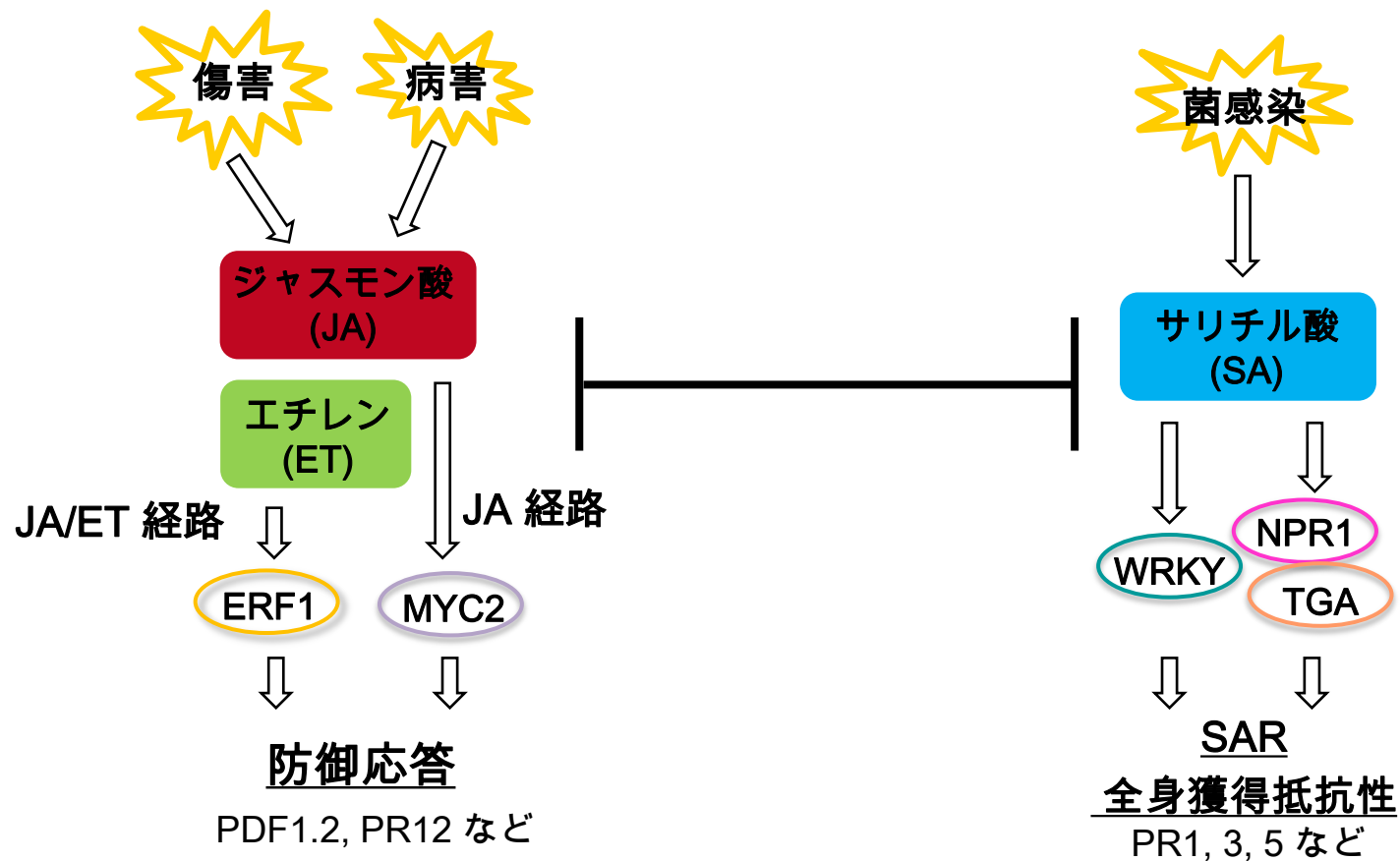
本研究テーマおよび、研究の場を与えて下さった当研究室の指導教官 小柴共一教授に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、様々なご指導ご鞭撻を下さった本研究室の岡本龍史准教授、研究系の確立、実験指導や議論をして下さった行田敦子博士(平成 20-25 年度 客員研究員)、研究を進める上でご助言を下さった瀬尾光範准教授(理研連携)に心より感謝いたします。また、本遺伝子をテーマとし、共に研究を行った高尾翠さん(平成 24 年度修士卒)、吉田悠里さん(平成 25 年度修士卒)、中島一成さん(学部 4 年生)に心より感謝いたします。

そして、RSOsPR10 過剰発現イネ・シバの実験およびデータの提供をして下さった寺川輝彦博士(北興化学工業(株))、イネの分与をして下さった矢野昌裕博士((独)農業生物資源研究所)[日本晴れ]、OsWRKY76 形質転換体を分与して下さった南栄一博士((独)農業生物資源研究所)[OsWRKY76 過剰発現体]、西澤洋子博士((独)農業生物資源研究所)[OsWRKY76 ノックアウト体]、particle bombardment 法による一過的発現系のご助言を下さった岡田憲典准教授(東京大学)、宮本皓司博士(東京大学・現帝京大学)、環境応答機構研究室木村泉美さん(修士 2 年)、ゲルシフトアッセイのご指導およびコンストラクトを分与して下さった横谷尚起博士((独)農業生物資源研究所)、西村岳志((独)農業生物資源研究所)、高木優教授(埼玉大学)、35S::GFP コンストラクトを分与して下さった丹羽康夫博士(静岡県立大学)、GATEWAY ベクターを分与して下さった中川強教授(島根大学)に心より感謝いたします。

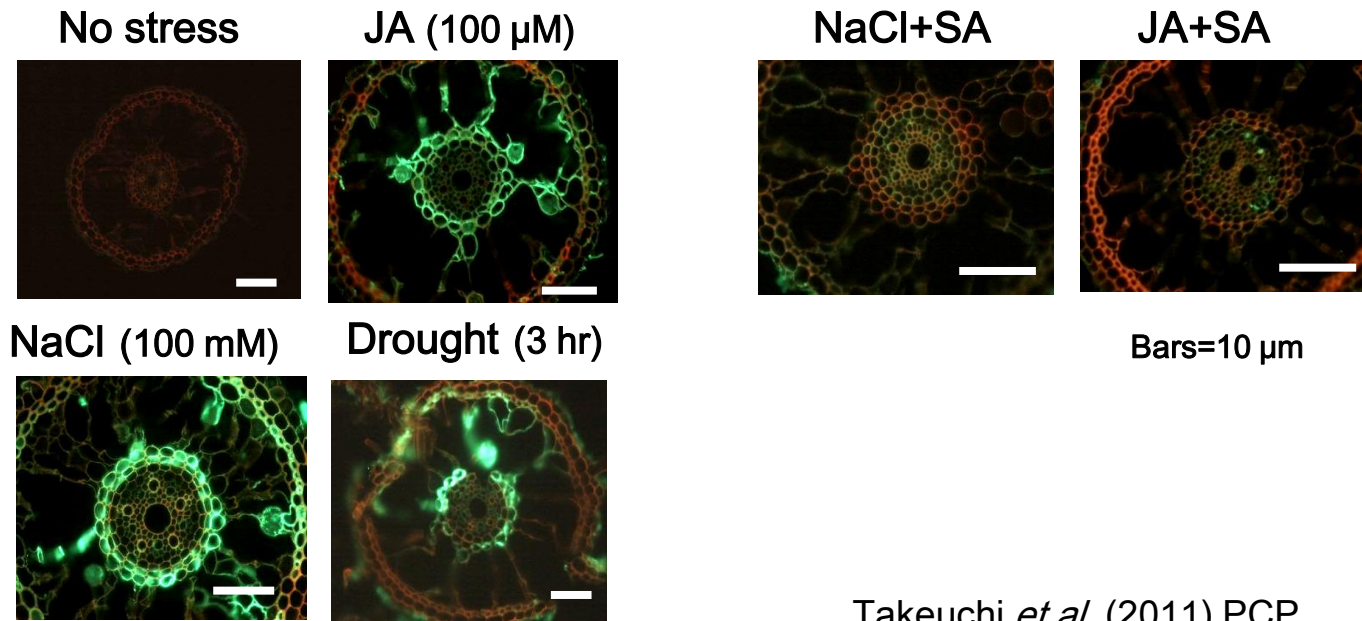
さらに、パーティクルガンの使用、デュアル LUC アッセイでのルミノメーターの使用で多大な協力をいただいた、植物環境応答機構研究室の門田明雄教授、鐘ヶ江健准教授、細胞生化学研究室内の川原裕之教授、横田直人助教に深く感謝いたします。

最後に、植物ホルモン機構研究室の皆様から公私にわたり様々なご支援を頂きましたことをこの場を借りて厚く御礼を申し上げます。



参考図1 植物の推定ストレス応答シグナル経路

主に病害(菌感染)により誘導されるサリチル酸経路、環境ストレス(乾燥、高塩濃度など)、病害・傷害により誘導されるジャスモン酸 / エチレン経路などが知られており、これらは互いに抑制し合って働くこと知られている。

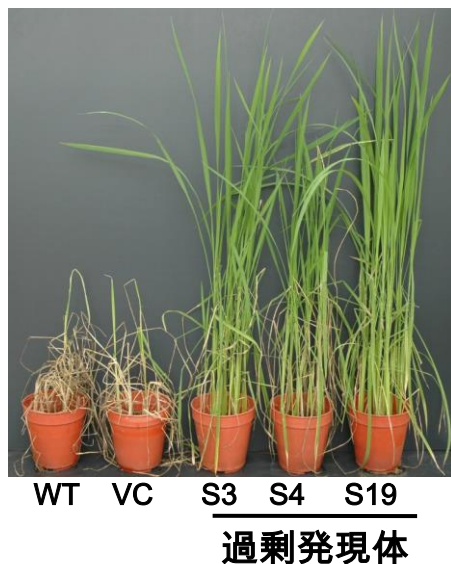


Takeuchi *et al.* (2011) PCP

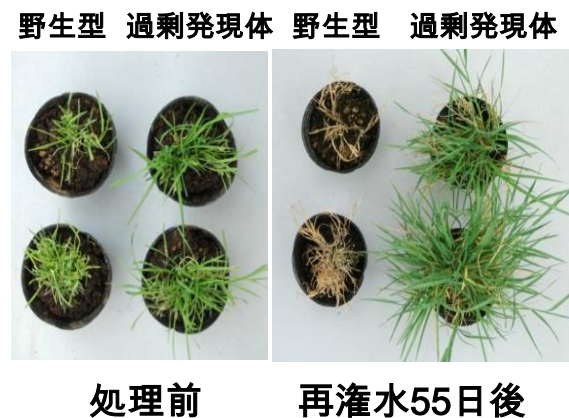
参考図 2 RSOsPR10 タンパク質の根における発現部位

当研究室の先行研究による特異的抗体を用いた免疫組織化学的観察により、RSOsPR10 タンパク質はジャスモン酸処理、塩、乾燥処理により根の維管束組織を取り囲む皮層細胞に蓄積することが明らかになった。一方でサリチル酸 (SA) を同時処理すると発現は観察されなかった。

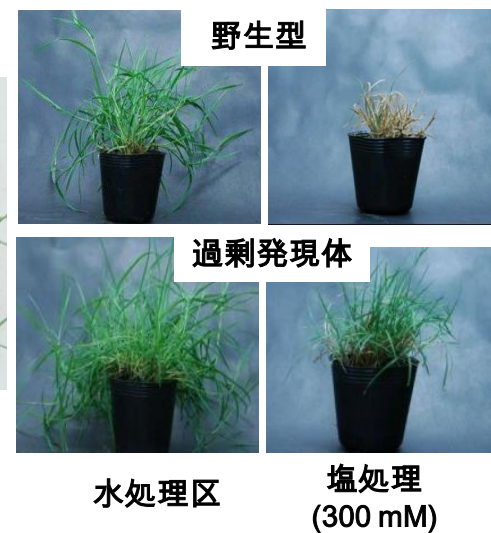
(A)



(B)



(C)



※ (独)農業生物資源研究所および、北興化学工業(株)との共同研究

参考図 3 RSOsPR10 過剰発現植物の性質

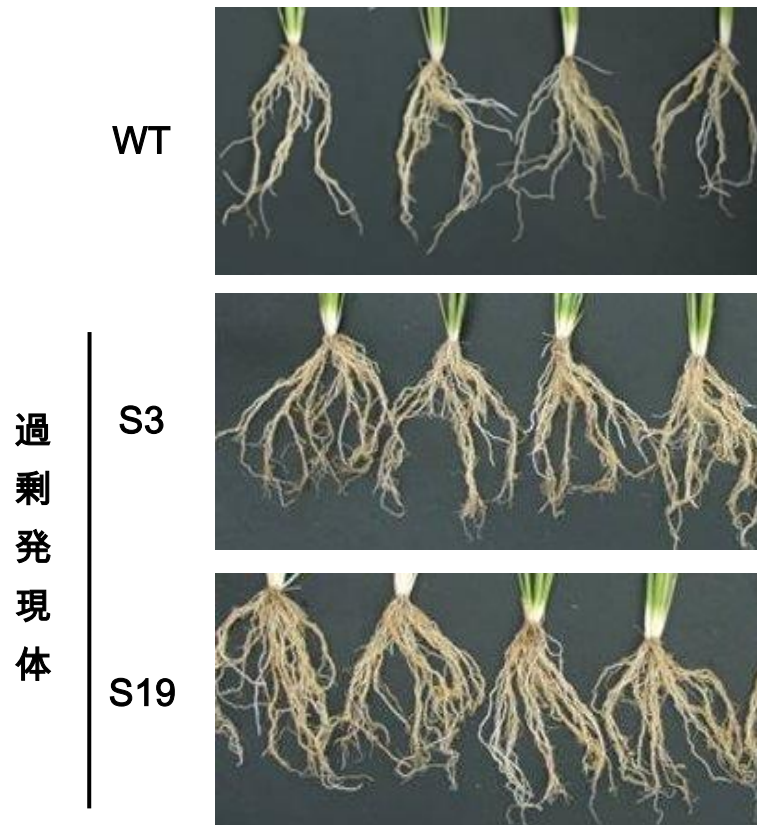
RSOsPR10 遺伝子を導入した形質転換イネ (A) と形質転換シバ (B, C)。

(A) 播種後1カ月のイネを10日間乾燥処理後、再灌水して1カ月生育させた。

(B) シバを26日乾燥処理後、再灌水して55日間生育させた。

(C) シバに、2日間隔でNaCl溶液を与えて、28日間生育させた。

過剰発現イネは野生型と比較して、高い乾燥耐性を示した。また、シバではさらに耐塩性の向上を示した。

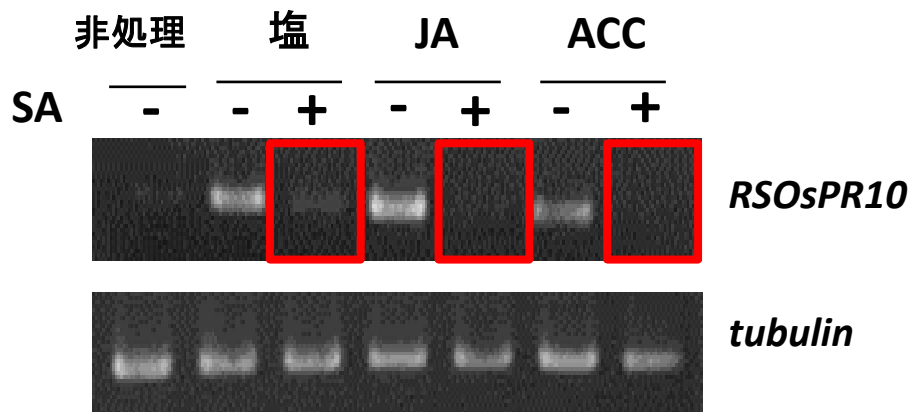


※ (独)農業生物資源研究所および
北興化学工業(株)との共同研究

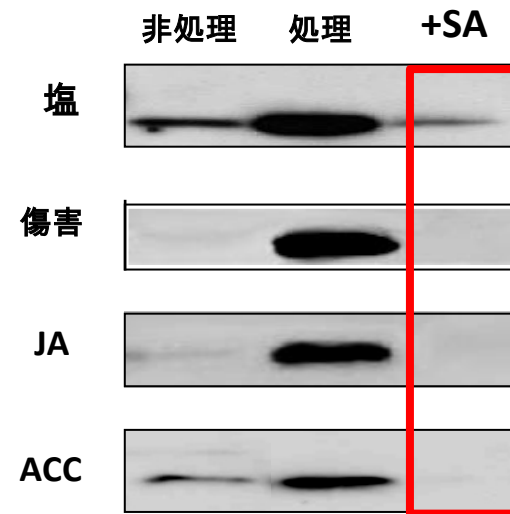
参考図 4 RSOsPR10 過剰発現体の根の観察

30日間の生育調査の結果、野生型と比較してRSOsPR10 を過剰発現する形質転換イネは根数、根重および茎数、茎葉重量の増加が確認された。

(A)



(B)



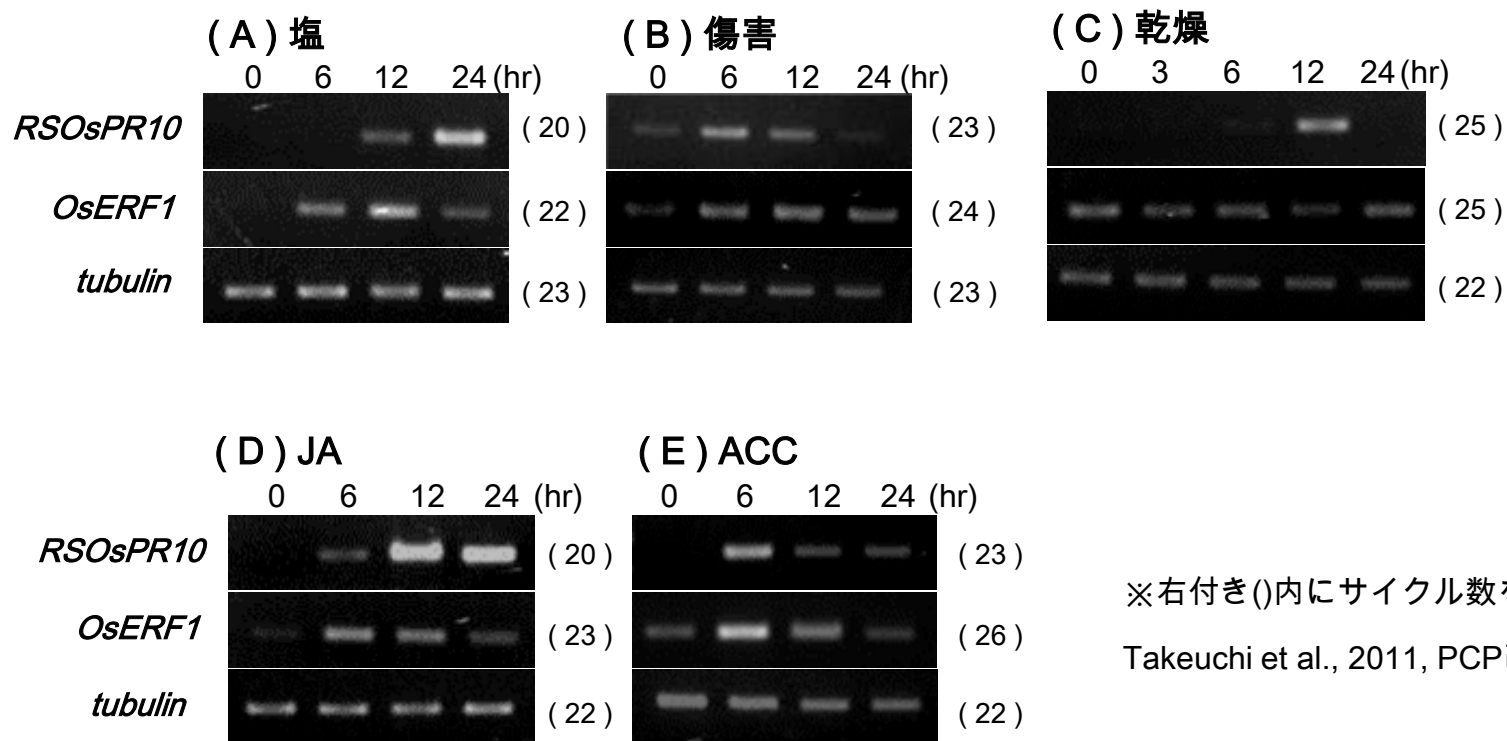
Takeuchi et al., 2011, PCP改変

参考図5 ストレスおよび植物ホルモン処理による RSOsPR10 発現の SA 処理による抑制

播種後2週間目のイネの根に塩 (NaCl) 100 mM、傷害、乾燥、JA 100 μ M、ACC 100 μ M 処理およびSA 100 μ M 同時処理を行い、*RSOsPR10* mRNA (A)、タンパク発現(B)を解析した。

(A) RT-PCR解析により転写レベルでのSAによる抑制が確認された。

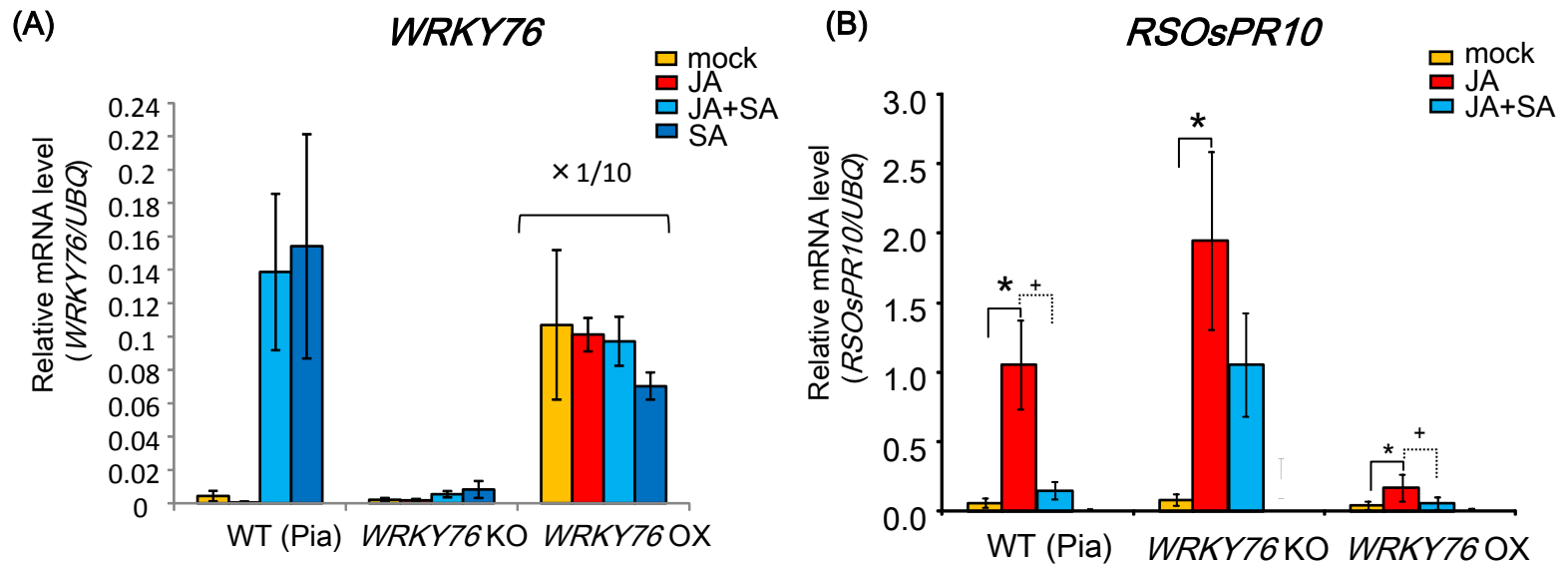
(B) Western blotting により翻訳レベルでのSAによる抑制が確認された。



参考図 6 ストレスおよび植物ホルモン処理時の *OsERF1* mRNA の経時的発現変化

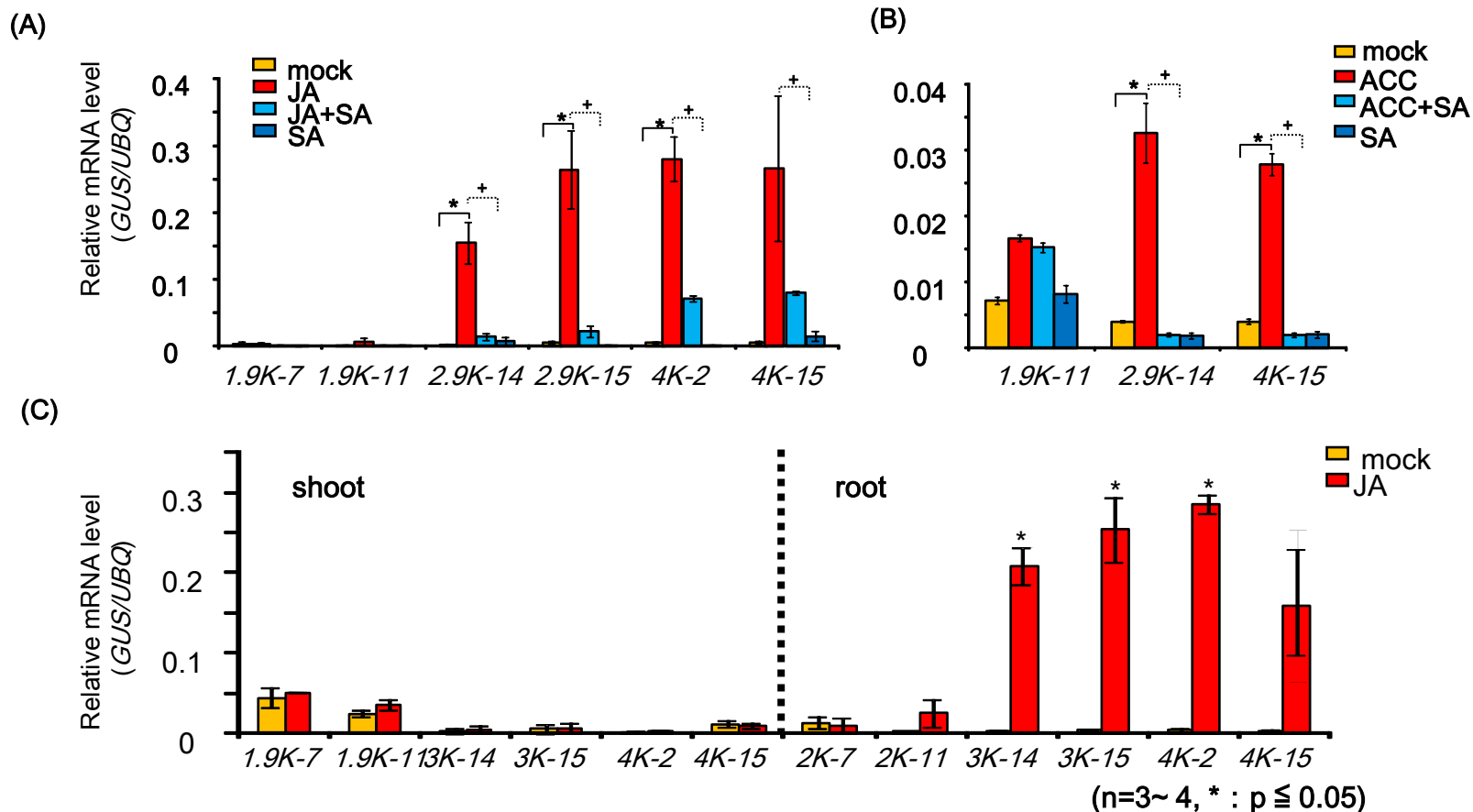
播種後2週間目のイネの根に(A) 塩 100 mM、(B) 傷害、(C) 乾燥、(D) JA 100 μ M、(E) ACC 100 μ M 処理を行い、6、12、24時間後の *OsERF1* mRNA の発現を解析した。

塩、JA 処理による *OsERF1* 発現は *RSOsPR10* 発現よりも先行して誘導され、傷害、ACC 処理による *OsERF1* 発現は *RSOsPR10* 発現と同時期であることが確認できた。



参考図 7 *WRKY76*形質転換体における *RSOsPR10* mRNA の発現量

各ホルモン処理後の(A) *WRKY76*, (B) *RSOsPR10* mRNAの発現量。生育9日目の形質転換イネに(A) JA (100 μ M), JA+SA (100 μ M, SA (100 μ M) を12時間後各 mRNAの発現量をqRT-PCRを用いて測定した。(値は平均値 \pm SE、t検定；mockとJA(* P <0.05)、JAとJA+SA (+ P <0.05)、個体数：n=3)



参考図8 *RSOsPR10*プロモーター::GUS 形質転換体における *GUS* mRNA の発現量

(A),(B) 各ホルモン処理後のGUS mRNAの発現量。生育9日目の形質転換イネに(A) JA (100 μ M), JA+SA (100 μ M), SA (100 μ M) を12時間、(B) ACC (100 μ M), ACC+SA (100 μ M), SA (100 μ M) 処理3時間後のGUS mRNAの発現量をqRT-PCRを用いて測定した。(C) 地上部と地下部におけるGUS mRNA 発現へのJA処理の影響。
(値は平均値 \pm SE、t 検定；mockとJA(* $P < 0.05$)、JAとJA+SA (+ $P < 0.05$)、個体数：n=3)

ファミリー	代表植物	機能
PR 1	タバコ トマト	不明（抗カビ活性）
PR 2	タバコ	β -グルカナーゼ
PR 3	タバコ	キチナーゼ
PR 4	タバコ	キチナーゼ
PR 5	タバコ イネ	不明（タウマチン）
PR 6	トマト	プロテアーゼ阻害
PR 7	トマト	エンドプロテアーゼ
PR 8	キュウリ	キチナーゼ
PR 9	コムギ	ペルオキシダーゼ
PR 10	パセリ イネ	不明（リボヌクレアーゼ活性、サイトカイニン結合活性）
PR 11	タバコ	キチナーゼ
PR 12	ラディッシュ	植物ディフェンシン
PR 13	シロイヌナズナ	チオニン
PR 14	オオムギ	不明（非特異的脂質輸送タンパク質）
PR 15	オオムギ	不明（シュウ酸オキシターゼ）
PR 16	オオムギ	不明（シュウ酸オキシターゼ類似タンパク質）
PR 17	タバコ	不明

参考表1 PR タンパク質の分類

現在知られているPRタンパク質ファミリーの分類、代表植物および機能を示す。多くはその機能が未だ不明である。

Cis-element	Motif	Associated TF	Location	Biological Function
GCC-box	GCCGCC	ERF	'-3276, -2893, -2867, -2843, -2827, -2497, -2071	JA/ET signaling
W-box	(T/C)TGAC(C/T)	WRKY	-3717, -2784, -1452, -1059, -508, -343, -263, -185	Biotic and abiotic stress, development
W-box like element (WLE)	TGACA	WRKY?	-3475, -3212, -1774, -1141	SA signaling
TGACG motif	TGACG	OsTGAP1	-2093	Elicitor response Bacterial attack
E-box	CANNTG	OsHHLH65(bHLH)	Many	Defense response (JA, ET, SA(?))
G-box	CACGTG	MYC2-like	no	
Dehydration-responsive element (DRE)	(A/G)CCGAC	DREB	-1991, -706, -197	Drought , ABA
JA responsive element (JERE)	AGACCGCC	???	no	JA signaling
ABA-responsive element (ABRE)	PyACGTGG/TC	OsZIP72	no	ABA, ACC, abiotic stress
NAC recognition core sequence	CGTGnnnnnnCACG	OsNAC5,6	no	Biotic and abiotic stress, development, senescence

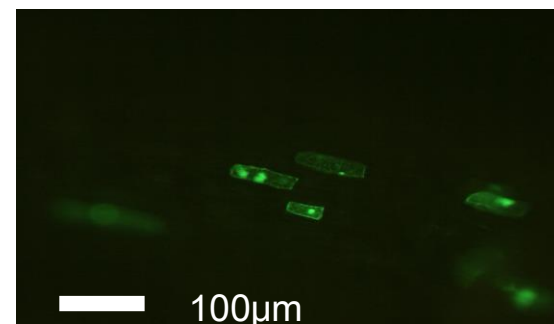
参考表2 *RSOsPR10* 遺伝子上流 4.0kb 領域におけるストレス応答転写因子認識配列

イネのストレス応答に関与する転写因子およびストレス刺激受容後に応答する植物ホルモンのシグナル伝達に関与する既知の情報伝達因子の結合配列として推定されているシス配列の中から、*RSOsPR10* 遺伝子の発現制御に関与が予想される因子およびシス配列を推定し、*RSOsPR10* プロモーター領域内に存在するか探索した。

(A)

金粒子の直径 (μm)	圧力 (Psi)	打ち込み距離(cm)	導入効率
0.6	1100	6	+
1.0	1100	6	++
1.0	1100	9	-
1.0	900	6	-
1.6	1100	6	-

(B)



(C)

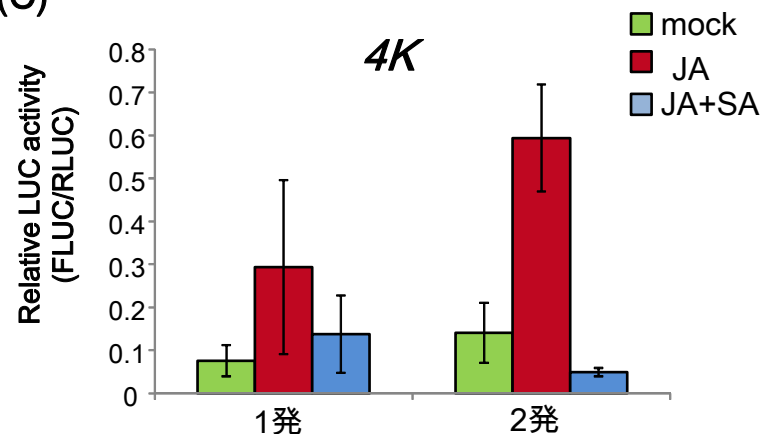


図1 イネの根へのパーティクルガンによる遺伝子導入の条件検討

(A) 導入効率の評価を *35S::GFP* を用いて検討した。

(B) 生育9日目イネの根に金粒子 1.0 μm 、圧力 1100 Psi、打ち込み距離 6 cm 条件で *35S::GFP* コンストラクトを遺伝子導入時のGFPシグナル。

(C) イネの根に *4K* を導入する際の、導入回数の違いによるLUC活性への影響の検討。

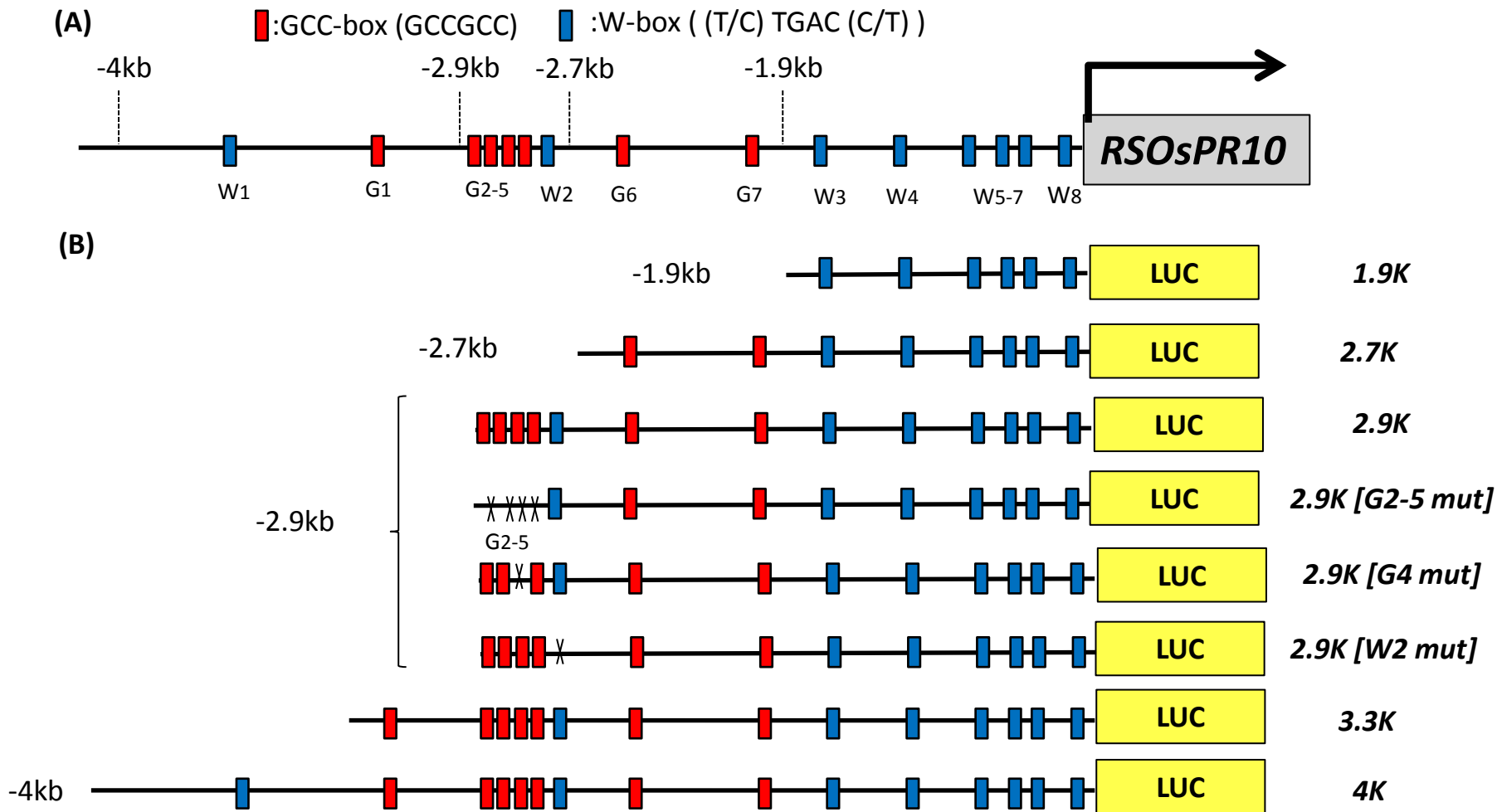


図2 プロモーター::レポーターコンストラクト

(A) *RSOsPR10* 遺伝子上流プロモーター領域 4.0 kb の模式図

(B) 異なる長さのプロモーター領域や変異挿入をしたシリーズをLUCレポーターに繋いだコンストラクト

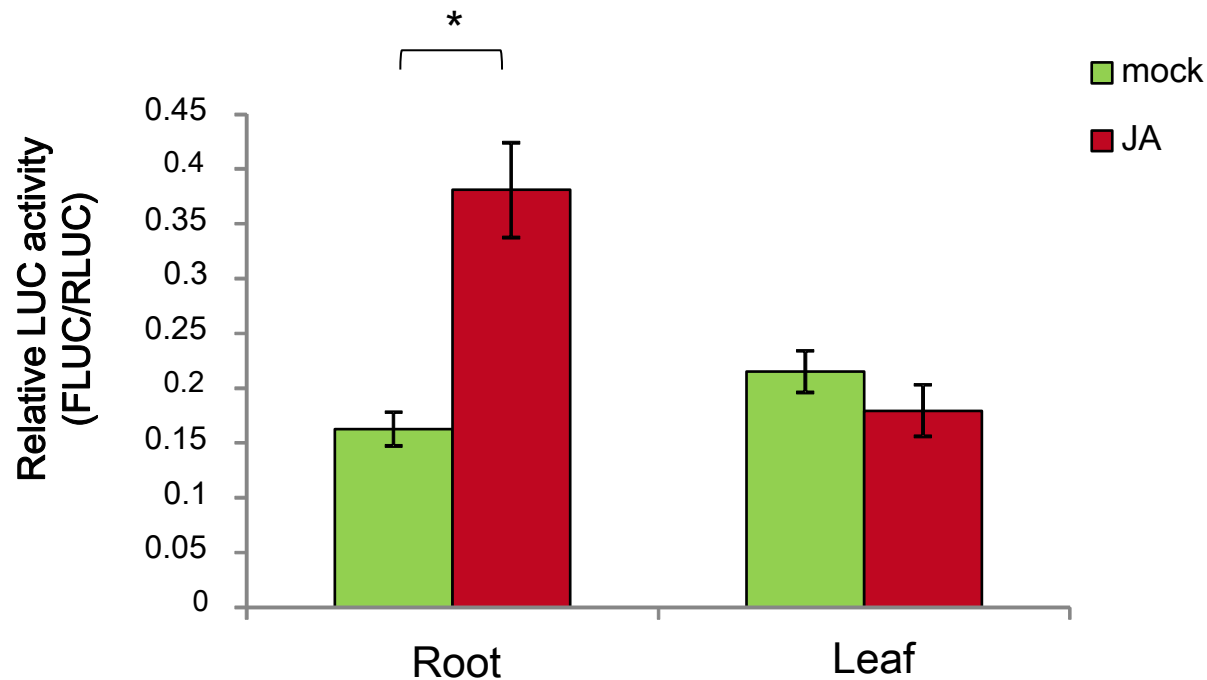


図3 遺伝子導入部位 (根および葉) における2.9KのJA 応答性

生育9日目の野生型イネの根および葉に2.9Kを導入後、JA (100 μ M) 処理を行い、12時間後のLUC活性を測定した。LUC活性のリファレンスにはrenilla LUC (RLUC) を用いた。
(値は平均値 \pm SE、t検定; mockとJA (* $P < 0.05$), 個体数 $n=3$, 実験回数3回)

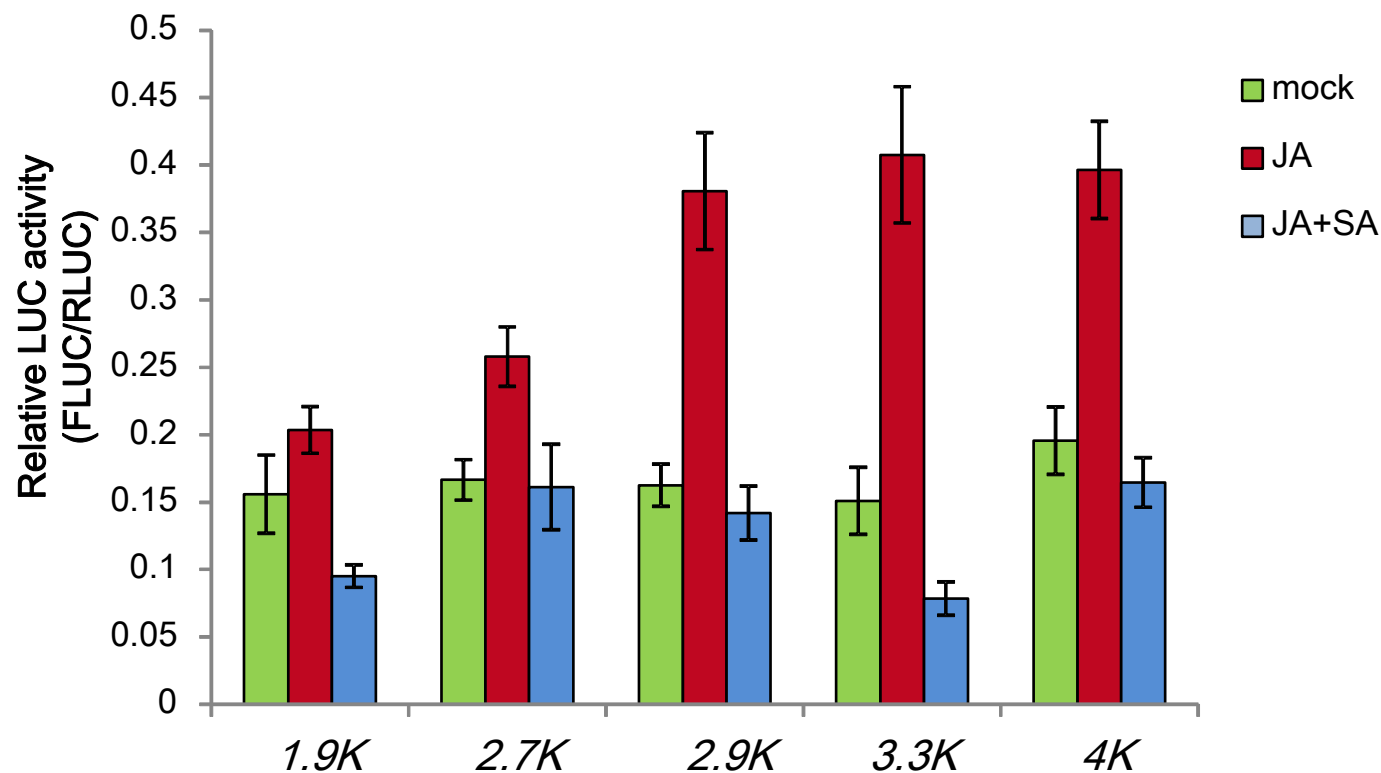
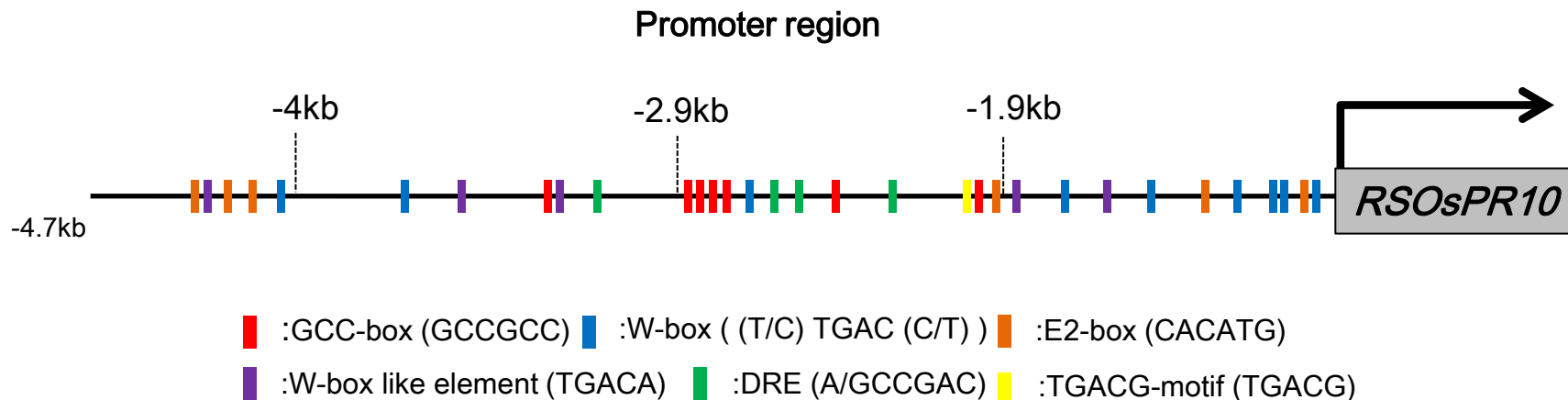


図4 イネ根における一過的発現解析

生育9日目WTイネの根に 1.9K, 2.7K, 3.3K, 4K を導入後、未処理(mock), JA (100 μ M)、JA+SA (100 μ M/100 μ M) 処理を行い、12時間後のLUC活性を測定した。LUC 活性のリファレンスにはrenilla LUC (RLUC) を用いた。
(値は平均値 \pm SE, 個体数n=3, 実験回数3回)



■ :GCC-box	ET および JA 応答性転写因子 ERF 結合配列
■ :W-box	病傷害応答因子 WRKY 結合配列
■ :W-box like	病傷害応答因子 WRKY 推定結合配列
■ :E2-box	ジャスモン酸応答性 bHLH 型転写因子結合配列
■ :TGACG-motif	エリシター応答性 bZIP 型転写因子結合配列
■ :DRE	乾燥ストレス応答性 因子 DREB 結合配列

図 5 *RSOsPR10* 遺伝子上流4 kb 領域におけるシス配列

GCC-box (GCCGCC) は7つ、DRE (A/GCCGAC) は4つ、TGACG-motif (TGACG) は1つ、W-box (T/CTGACC/T) は9つ存在している。一方で、JA応答配列JERE (AGACCGCC) やJA応答性転写因子MYC2の結合配列G-box (CACGTG) など、JA誘導性に関与が想定されるようなシス配列は見つかっていない。

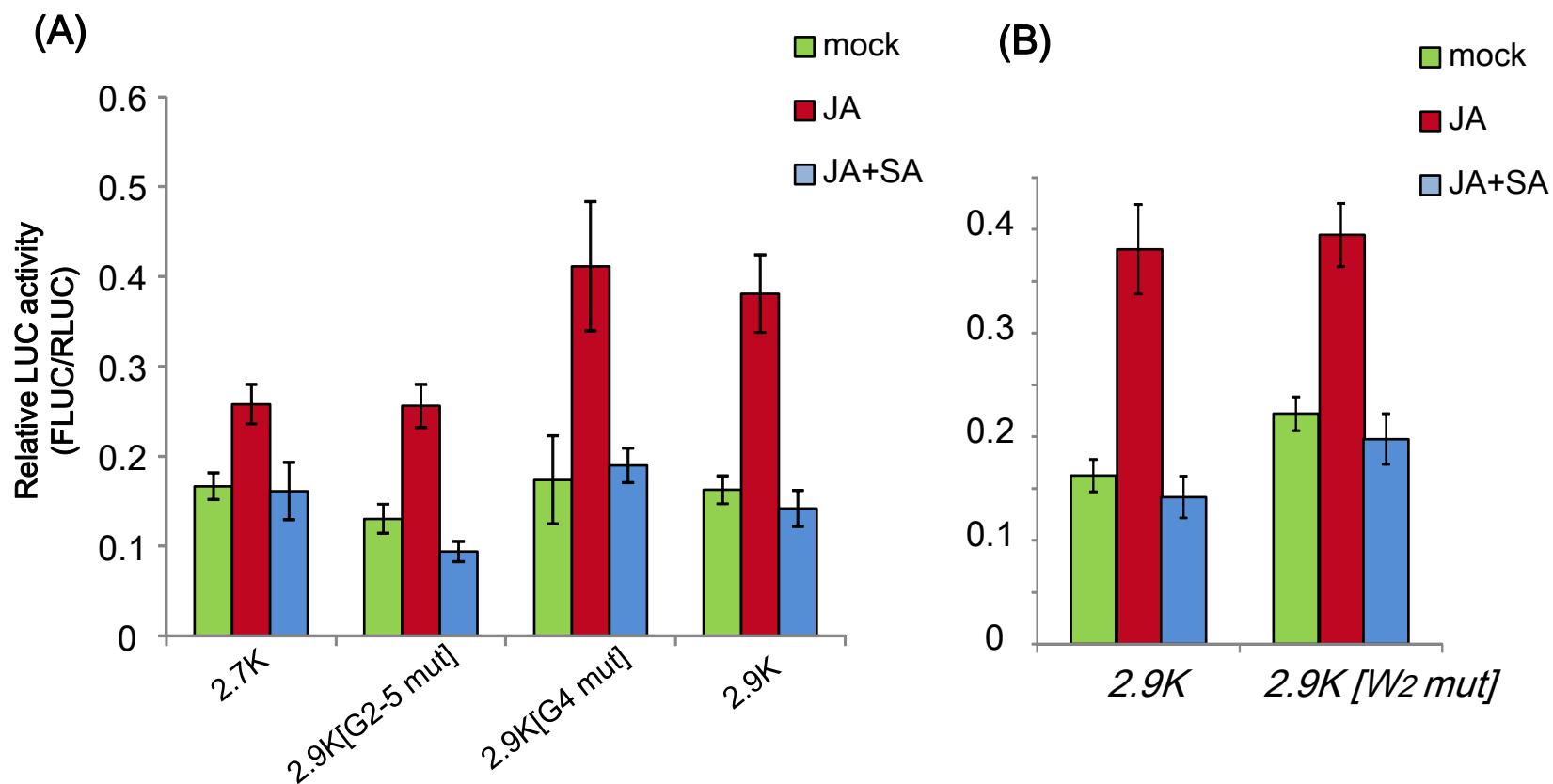
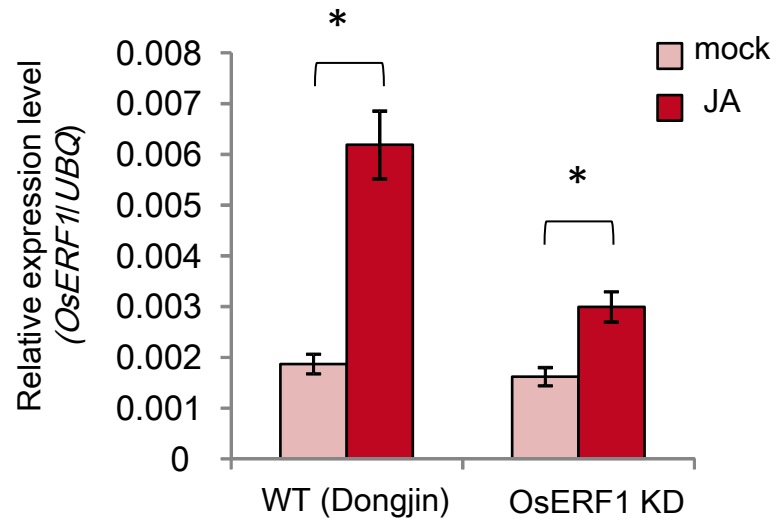


図6 GCC-box, W-box 変異挿入によるLUC 活性への影響

生育9日目WT イネの根にGCC-boxに変異(A)およびW-boxに変異(B)を入れたコンストラクトを導入後、未処理、JA (100 μ M)、JA+SA (100 μ M/ 100 μ M) 処理を行い、12時間後のLUC活性を測定した。
(値は平均値 \pm SE, 個体数n=3以上, 実験回数3回)

(A)

OsERF1

(B)

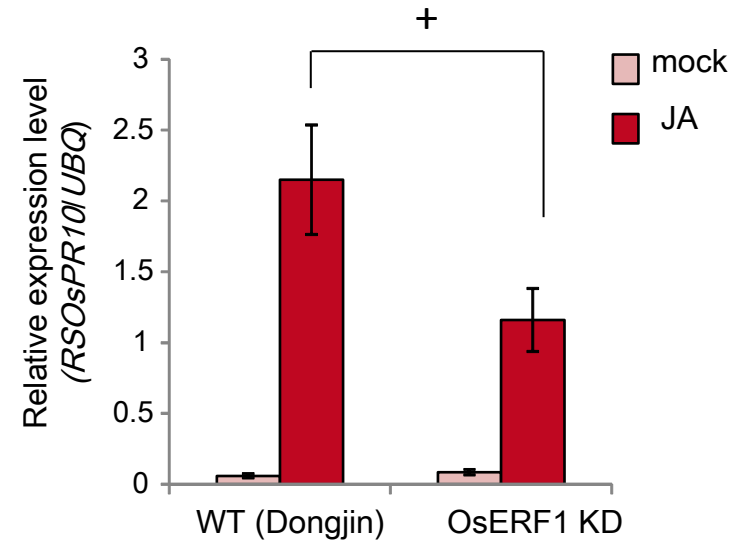
RSOsPR10

図7 *OsERF1* T-DNA挿入イネにおける *OsERF1* と *RSOsPR10* mRNA の発現量

生育9日目のT-DNA 挿入イネに未処理およびJA (100 μ M) 処理を行い、12時間の *OsERF1* mRNA (A) および *RSOsPR10* mRNA (B) をqRT-PCRで測定した。

値は平均値 \pm SE、有意差；MockとJA (* P <0.05)、WT-JA (Dongjin)とOsERF1 KD-JA (+ P <0.05), 個体数 n =3以上, 実験回数3回。

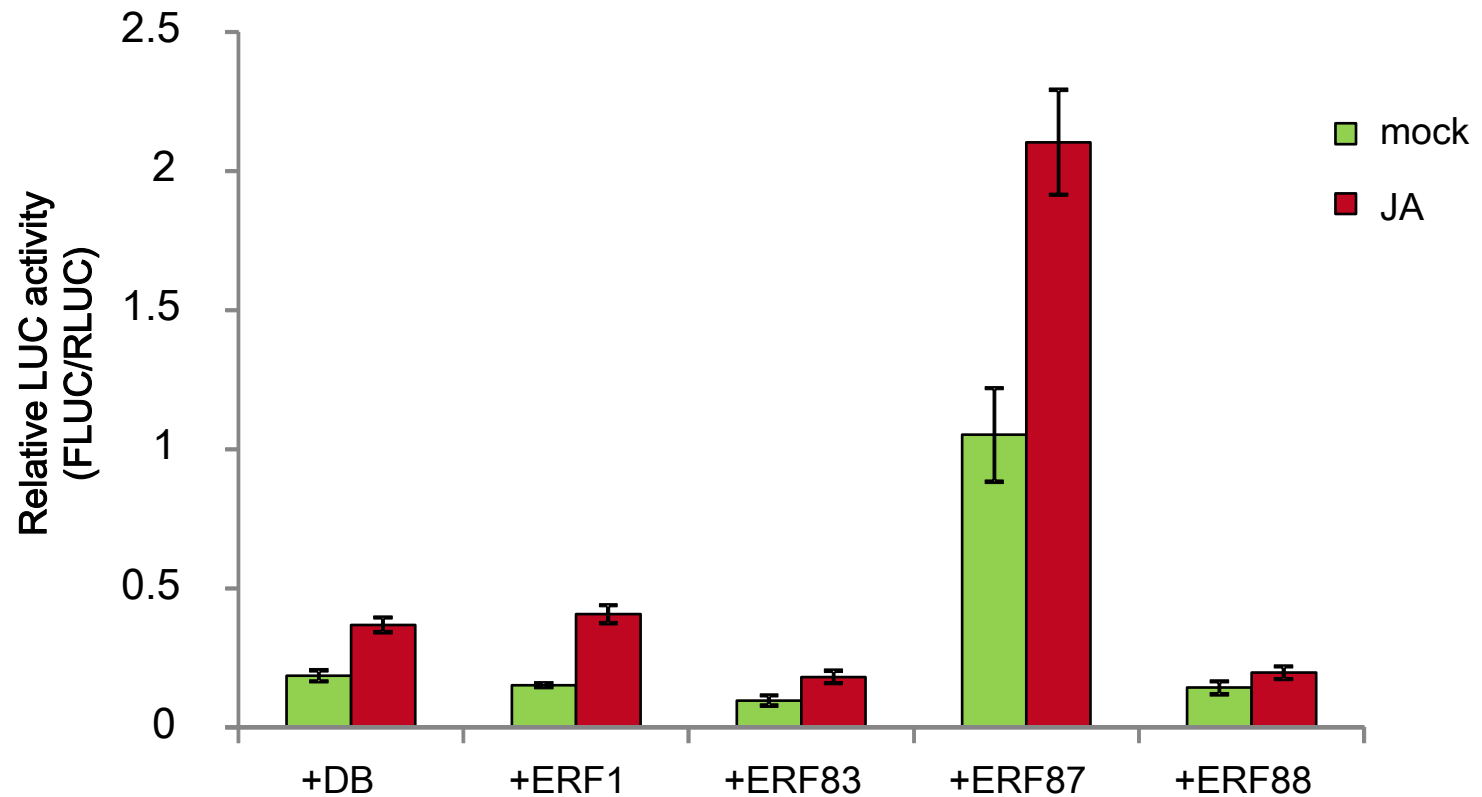


図8 各ERF発現コンストラクトと*2.9K*共導入によるエフェクターアッセイ

生育9日目の野生型イネの根に各コンストラクトを導入後、未処理およびJA (100 μ M) 処理を行い、12時間後のLUC活性を測定した。(値は平均値 \pm SE, 個体数n=3以上, 実験回数3回 (ERF88は2回))

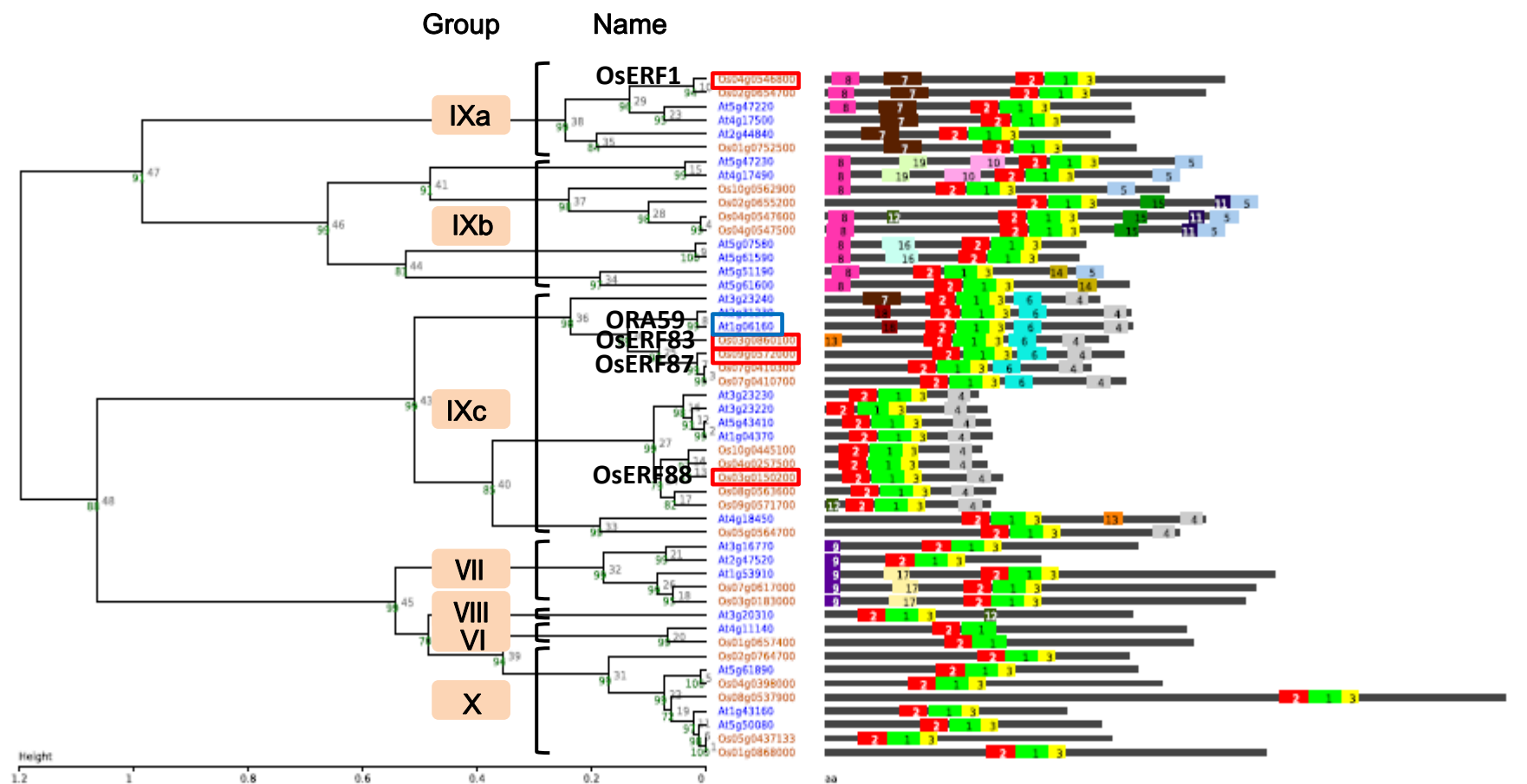


図9 SALAD DBを用いたORA59とのタンパクモチーフ解析

SALAD DBを用いてシロイヌナズナORA59のタンパクモチーフとイネのERFタンパクモチーフの相同性を検索した。シロイヌナズナのERFは10のグループ、イネのERFは14のグループに分類されているが、その中でもグループVI, VII, VIII, IX, X を図示した。

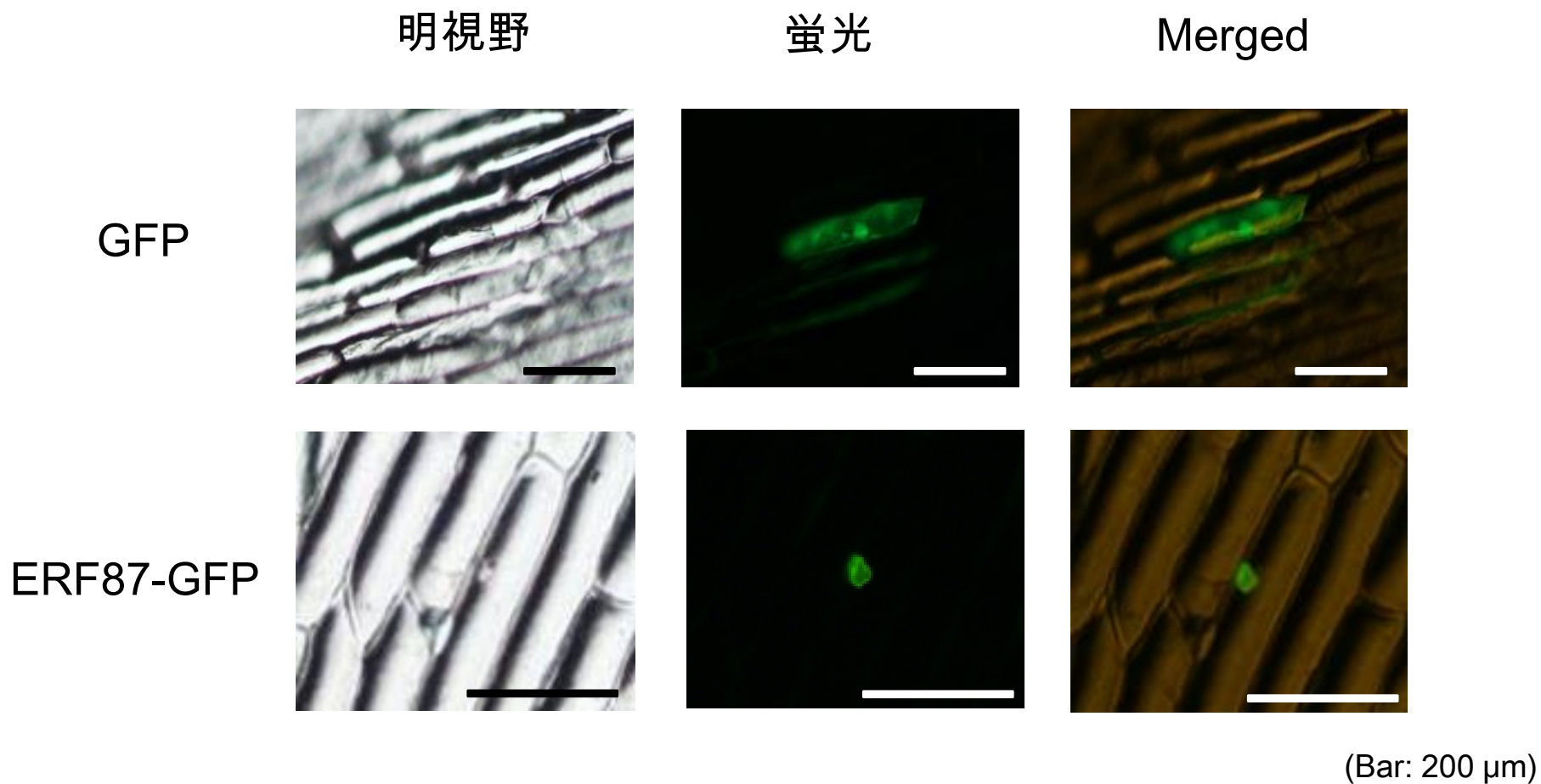


図10 細胞内でのERF87局在解析

35S::GFP, *35S::ERF87-GFP*をタマネギの表皮細胞にparticle bombardment 法により導入した。
遺伝子導入条件は1,100 Psi, 6 cm 。バーは200 μ mを表す。

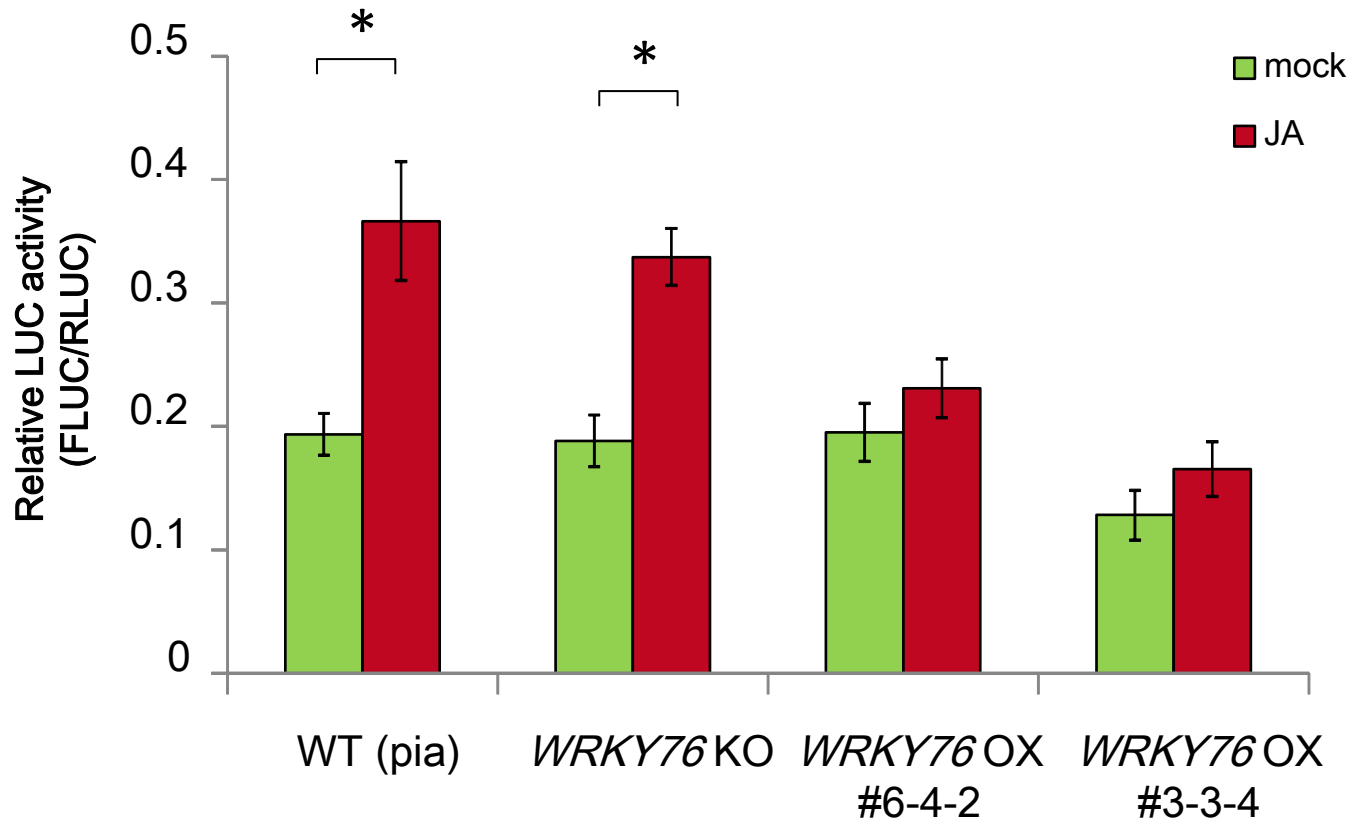


図11 *OsWRKY76* 形質転換イネにおける2.9K導入によるLUC 活性

生育9日目の *OsWRKY76* 形質転換イネの根に2.9Kを導入後、未処理およびJA (100 μ M) 処理を行い、12時間後のLUC活性を測定した。*WRKY76* OX #6-4-2, *WRKY76* OX #3-3-4 は異なる系統を示している。
(値は平均値 \pm SE, t検定 ; MockとJA (*P<0.05), 個体数n=3以上, 実験回数3回)

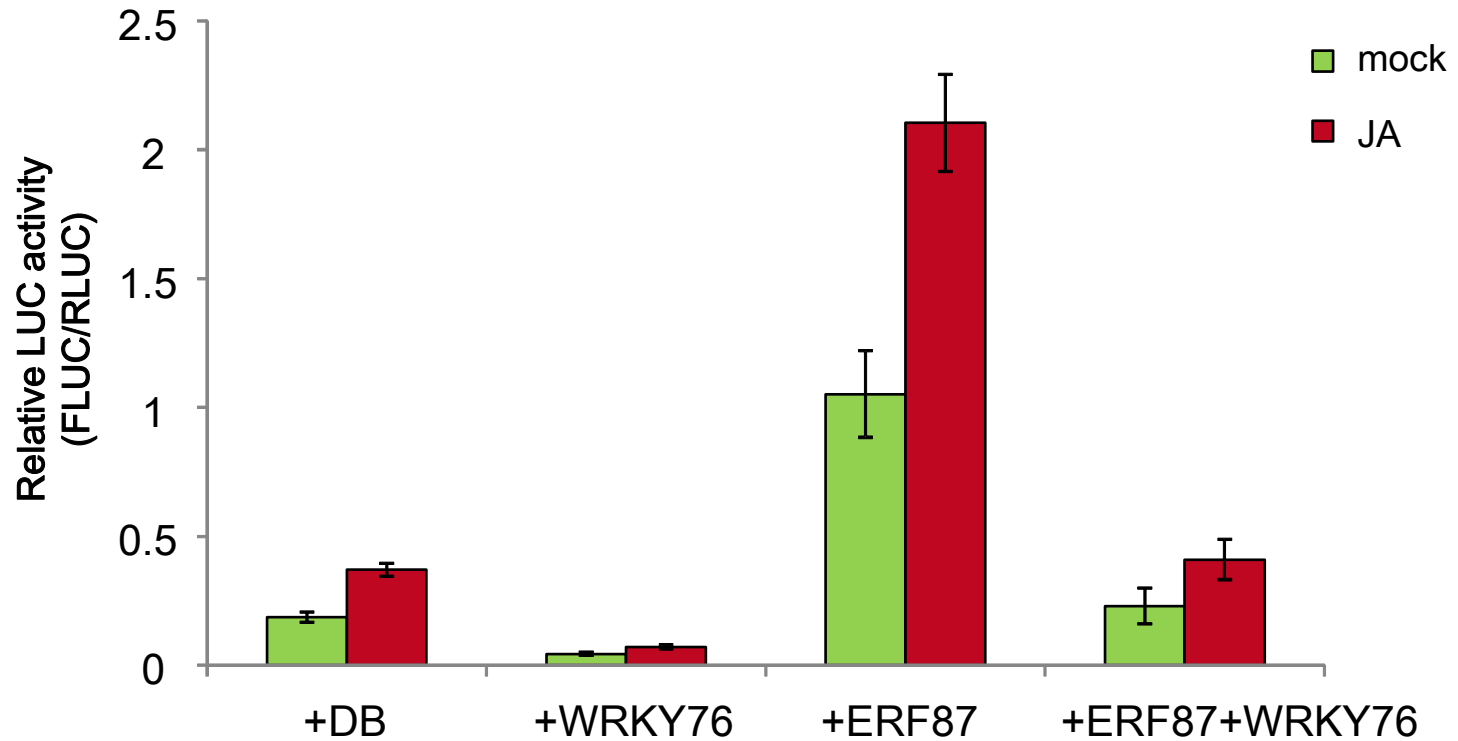


図12 WRKY76 過剰発現コンストラクトと2.9K共導入によるエフェクターアッセイ

生育9日目の野生型イネの根に各エフェクターコンストラクトと2.9Kを導入後、未処理およびJA (100 μ M) 処理を行い、12時間後のLUC活性を測定した。(値は平均値 \pm SE, 個体数n=3以上, 実験回数3回 (+ERF87+WRKY76は2回))

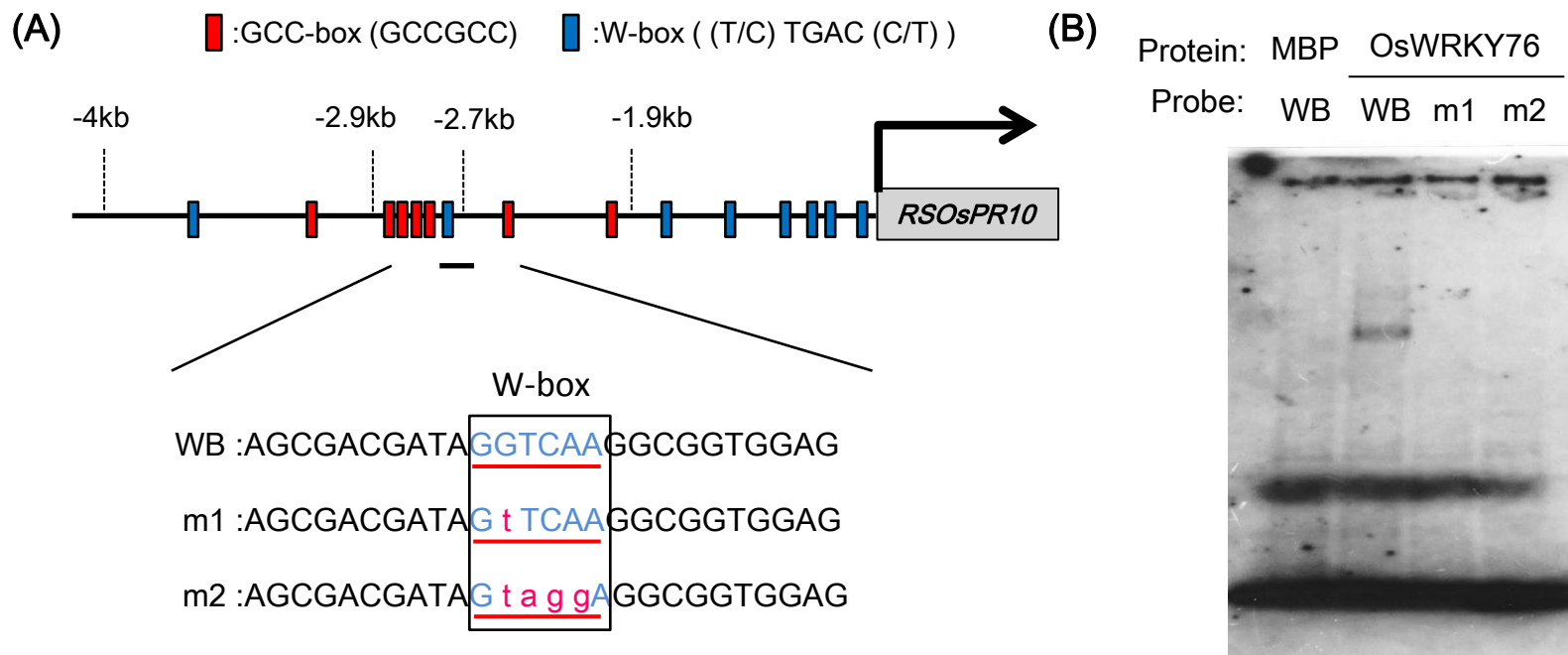


図13 ゲルシフトアッセイによるOsWRKY76 のW-box 配列への結合解析

(A) ゲルシフトアッセイに使用した各プローブの塩基配列。プローブはDIGでラベルした。
(B) MBP(negative control)およびMBP-OsWRKY76リコンビナントタンパクと(A)の各プローブを用いてゲルシフトアッセイを行った。

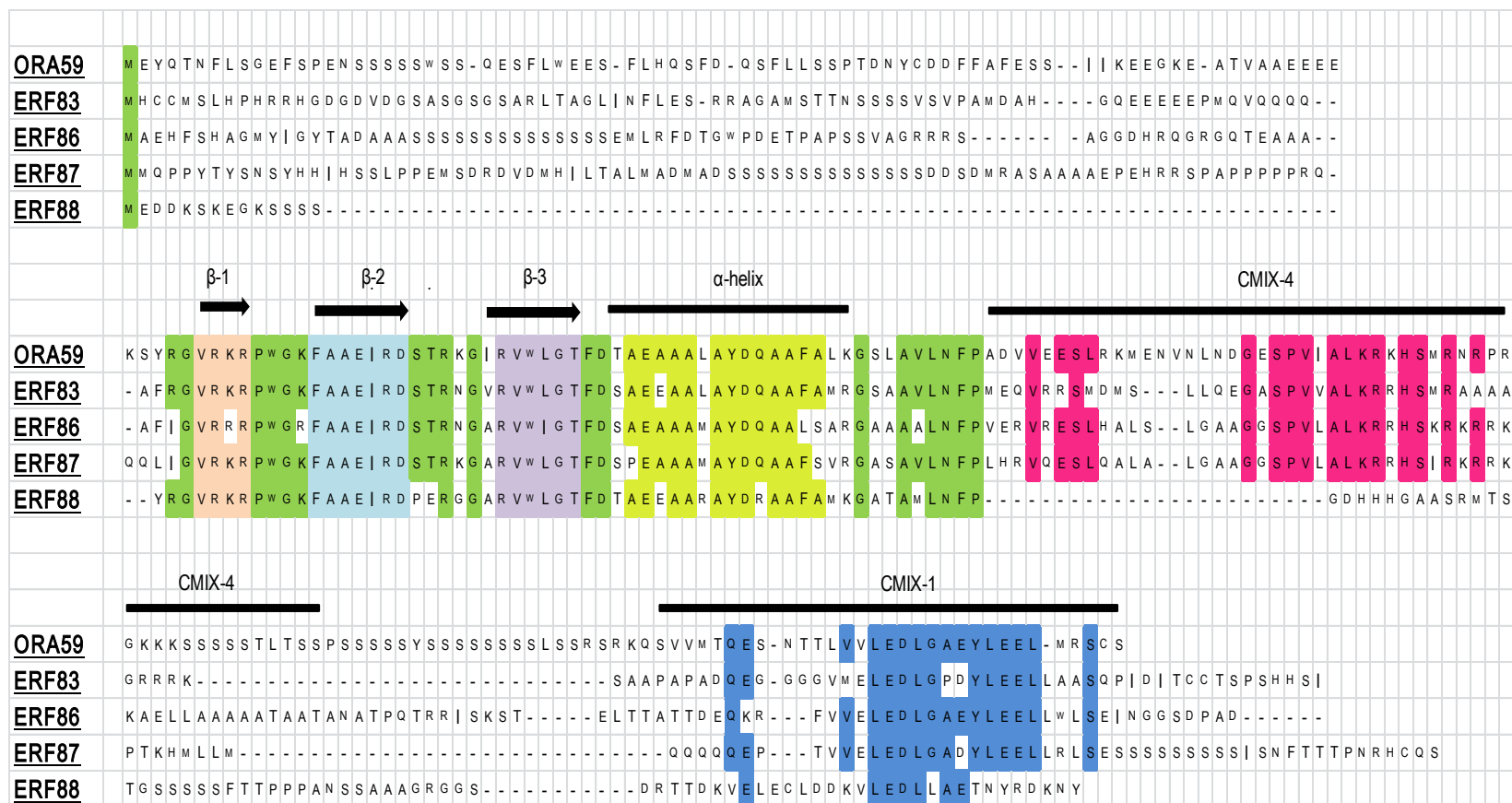
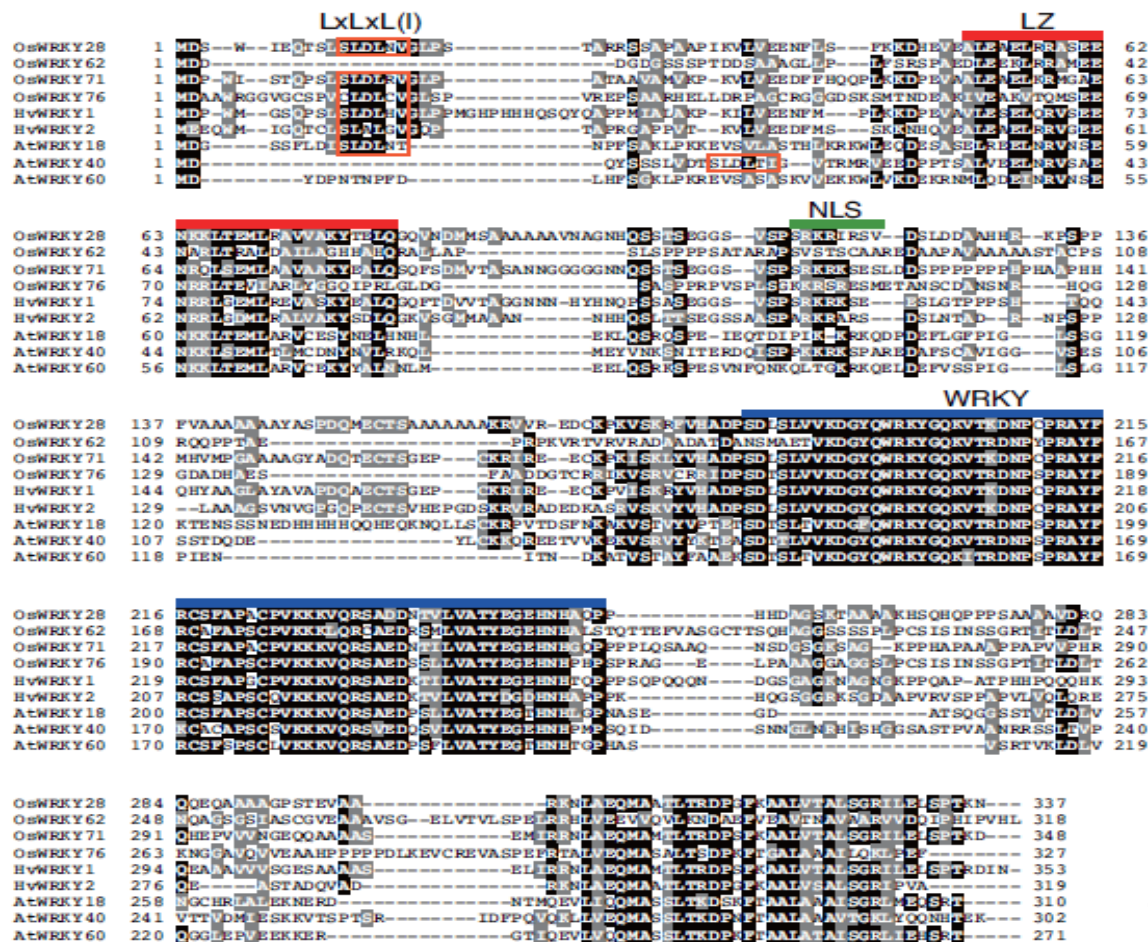


図14 ERFグループIXcにおけるシロイヌナズナORA59とイネERFのアミノ酸配列比較

Clustal W2 およびGENETYXを参考にし、アミノ酸配列をアライメントした。β-1, β-2, β-3, α-helix はERFが共通して持つドメインである。CMIX-1, CMIX-4はERFグループIXcのみが持つ特徴的なドメインだが、機能は明らかとなっていない。

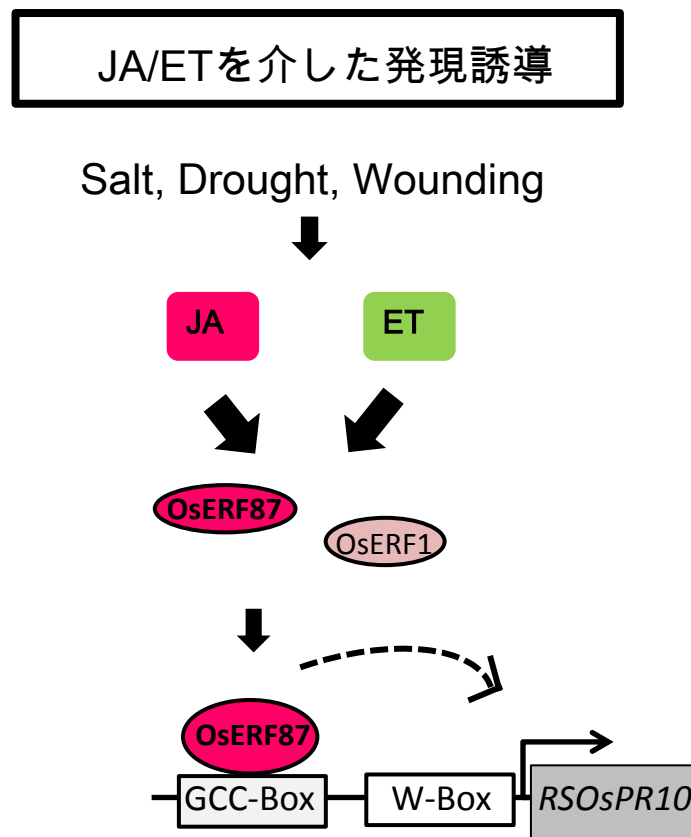


(Chujo et al., 2013) Fig.S1

図15 WRKYIIaグループにおけるアミノ酸配列比較 (イネ、シロイヌナズナ、オオムギ)

CLUSTAL W を用いたWRKYIIaグループにおけるアミノ酸配列比較。保存性の高いアミノ酸は黒色、類似のアミノ酸は灰色で示している。LxLxL(I) は推定の抑制ドメイン、LZはロイシンジッパーモチーフ、NLSは推定核移行シグナル、WRKYはDNA結合領域を示している。

(A)



(B)

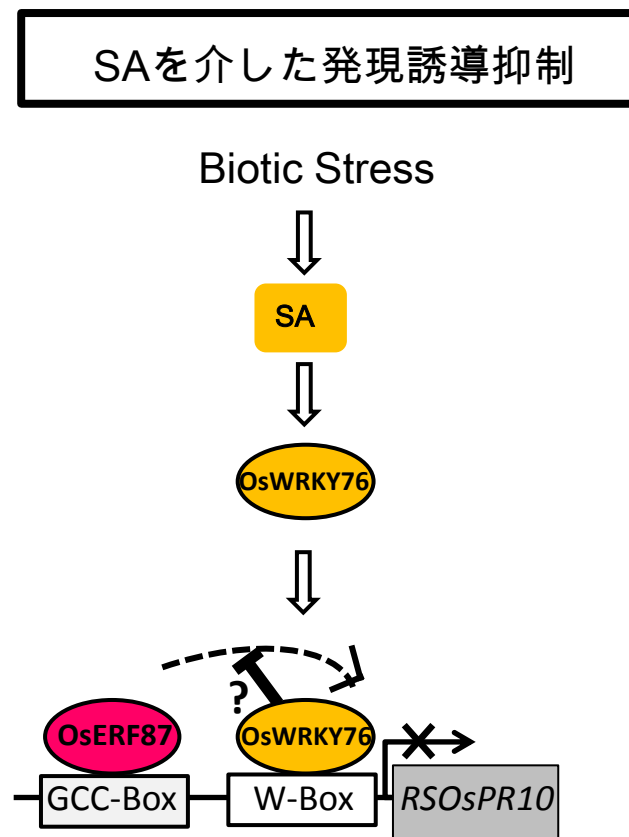


図16 RSOsPR10の発現シグナル経路 (推定)

(A) JA/ET経路を介したRSOsPR10発現誘導のシグナル推定経路図。

環境ストレス（塩や乾燥）を受容するとJA/ET経路を介してOsERF87やOsERF1が誘導され、GCC-boxに結合することでRSOsPR10の発現を誘導する。

(B) SAを介したRSOsPR10誘導抑制のシグナル推定経路図。

生物的ストレス（菌感染）を受容するとSAを介してOsWRKY76が誘導され、W-boxに結合することでRSOsPR10の誘導を抑制する。